Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

# THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 17 décembre 2024 par


## Maxime POINSOT


# Modélisation standardisée des neuropathologies sur puce grâce à une plateforme multimodale d'analyses multiplexée

**Discipline**
Biologie Santé

**Spécialité**
Neurosciences

**École doctorale**
ED 62 – SCIENCES DE LA VIE
ET DE LA SANTE

**Laboratoire/Partenaires de recherche**
Fluigent

**Composition du jury**

| | |
|---|---|
| Sophie HALLIEZ<br>LilNCog, Lille | Rapporteuse |
| Vincent STUDER<br>IINS, Bordeaux | Rapporteur |
| Stéphanie DESCROIX<br>Institut Curie, Paris | Examinatrice |
| Laurent MALAQUIN<br>LAAS, Toulouse | Examinateur |
| Sophie CHAUVET<br>IBDM, Marseille | Présidente du jury |
| Eduardo GASCON GONZALO<br>INT, Marseille | Directeur de thèse |
| Maxime CAZORLA<br>INT, Marseille | Co-directeur de thèse |
| William CESAR<br>Fluigent, Paris | Invité |

# Affidavit

Je soussigné, Poinsot Maxime déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Maxime Cazorla et Eduardo Gascon Gonzalo, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.
Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 15 octobre 2024



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

# Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences

1) Liste des publications et/ou brevet réalisées dans le cadre du projet de thèse :

    1. Biologically grounded brain-on-chip model identifies selective topographic reorganization within hyperexcitable neural networks (Poinsot et al. 2024) (https://doi.org/10.1101/2024.09.30.615880 BioRxiv)
    2. Brevet: LIQUID DISTRIBUTION SYSTEM FOR A FLUIDIC CHIP filed on Nov 23

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :
    1. Neurofrance 2023 – Lyon, France – Poster – "Brain-on-chip : a functional analysis platform to study the plasticity of neural networks" Poinsot Maxime[1,2], Dos Santos Marine[1], César William[2], Charlot Benoit[3], Cazorla Maxime[1].
    2. Microphysiological systems, from organoids to organs-on-chip 2024 – Cargèse, France – Poster – "A Tesla Valve-Inspired Microfluidic Plateform for Analysing Neurodevelopmental Brain Circuit Alterations" Poinsot Maxime[1], Dos Santos Marine[1], Marthy Baptiste[4], Borges-Correia Ana[1], Gascon-Gonzalo Eduardo[1], Charlot Benoit[3], Cazorla Maxime[1].

# Résumé

Les recherches sur les réseaux neuronaux ont révélé leur importance dans les fonctions cognitives et dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives, neurodéveloppementales et psychiatriques. Parmi eux, le réseau cortico-striatal joue un rôle central dans divers processus cognitifs et son altération est impliquée dans de nombreuses neuropathologies, telles que la maladie de Parkinson ou les troubles du spectre autistique. Ce réseau se distingue par des projections corticales unidirectionnelles qui connectent de manière spécifique les régions du striatum, formant une organisation topographique complexe.

Cependant, l'étude des réseaux neuronaux humains est principalement limitée aux techniques de neuroimagerie, qui offrent une vision indirecte des mécanismes sous-jacents à l'origine des altérations physiologiques ou pathologiques. De plus, les modèles actuels présentent des limitations. Les modèles *in vivo* permettent d'observer des modifications dans un environnement physiologique, mais ils sont peu adaptés à l'exploration des mécanismes cellulaires précis, difficiles d'accès, et posent des questions éthiques. Quant aux modèles *in vitro*, ils peinent à reproduire la complexité architecturale et fonctionnelle des réseaux neuronaux, notamment la topographie et les interactions dynamiques, réduisant ainsi leur pertinence.

Les organes-sur-puce, notamment les cerveaux-sur-puce, offrent une solution prometteuse à ces limitations. Ces dispositifs microfluidiques permettent de recréer la microarchitecture des organes dans un environnement contrôlé, simulant certaines fonctions biologiques avec une grande précision. Ils offrent une nouvelle plateforme pour étudier les mécanismes neuronaux complexes liés aux pathologies humaines. Aujourd'hui, les cerveaux-sur-puce atteignent un stade de maturité suffisant pour modéliser les réseaux neuronaux *in vitro*, et bien que certaines études aient reproduit des réseaux corticaux, la topographie spécifique du réseau cortico-striatal n'a pas encore été pleinement explorée.

Le premier objectif de cette thèse est donc de développer un modèle de cerveau-sur-puce capable de reproduire cette topographie unique. Ce modèle permettra d'explorer la topographie du réseau cortico-striatal dans des contextes pathologiques, tels que les troubles

neurodéveloppementaux, et d'ouvrir de nouvelles perspectives pour l'étude des mécanismes sous-jacents de ces pathologies. Ce travail répond à un besoin crucial en fournissant un outil innovant pour l'étude des réseaux neuronaux, jusque-là difficilement accessible.

Parallèlement, la démocratisation de la technologie des organes-sur-puce est encore entravée par certains défis techniques. Bien que cette technologie soit en phase de maturation, il reste nécessaire de la rendre plus accessible. Le second objectif de cette thèse, réalisée en partenariat avec l'entreprise Fluigent dans le cadre d'une CIFRE, est de développer une machine microfluidique autonome capable de gérer de manière multiplexée le modèle de cerveau-sur-puce précédemment mentionné. Cette machine devra être versatile, compatible avec les équipements analytiques déjà utilisés en laboratoire et en industrie, tout en garantissant des résultats robustes et reproductibles. En développant cette plateforme, l'objectif est de faciliter l'adoption des organes-sur-puce par la communauté scientifique en standardisant et simplifiant leur utilisation.

Mots-clés: Réseaux neuronaux, Modélisation *in vitro* des réseaux neuronaux, Organe-sur-puce, Cerveau-sur-puce, Microfluidique, Plateforme *in vitro* multiplexée.

## Abstract

Research on neural networks has revealed their importance in cognitive functions and in the pathogenesis of neurodegenerative, neurodevelopmental, and psychiatric disorders. Among them, the cortico-striatal network plays a central role in various cognitive processes, and its alteration is implicated in numerous neuropathologies, such as Parkinson's disease or autism spectrum disorders. This network is characterized by unidirectional cortical projections that specifically connect different regions of the striatum, forming a complex topographical organization.

However, the study of human neural networks is mainly limited to neuroimaging techniques, which offer only an indirect view of the underlying mechanisms responsible for physiological changes or pathological alterations. Moreover, current models have their limitations. *In vivo* models allow the observation of network modifications in a physiological environment but are not well suited for exploring specific cellular mechanisms, which are

difficult to access, and raise ethical concerns. *In vitro* models, on the other hand, struggle to reproduce the architectural and functional complexity of neural networks, particularly the topography and dynamic interactions, thus limiting their relevance.

Organ-on-a-chip systems, especially brain-on-a-chip models, offer a promising solution to these limitations. These microfluidic devices allow the recreation of organ microarchitecture in a controlled environment, simulating certain biological functions with great precision. They provide a new platform to study complex neuronal mechanisms related to human pathologies. Today, brain-on-a-chip models have reached a sufficient level of maturity to enable the *in vitro* modeling of neural networks. Although some studies have successfully reproduced cortical networks, the specific topography of the cortico-striatal network has not yet been fully explored.

The primary goal of this thesis is to develop a brain-on-a-chip model capable of reproducing this unique topography. This model will allow the exploration of the cortico-striatal network's topography in pathological contexts, such as neurodevelopmental disorders, and will open new perspectives for studying the underlying mechanisms of these pathologies. This work addresses a crucial need by providing an innovative tool for studying neural networks, which until now has been difficult to access.

At the same time, the democratization of organ-on-a-chip technology still faces certain technical challenges. Although this technology is reaching a maturation phase, it remains necessary to make it more accessible. The second goal of this thesis, carried out in partnership with the company Fluigent as part of a CIFRE project, is to develop an autonomous microfluidic machine capable of multiplexed management of the aforementioned brain-on-a-chip model. This machine must be versatile, compatible with analytical equipment already used in laboratories and industries, while ensuring robust and reproducible results. By developing this platform, the aim is to facilitate the adoption of organ-on-a-chip systems by the scientific community by standardizing and simplifying their use.

Keywords: Neural network, *In vitro* modelling of neural network, Organ-on-chip, Brain-on-chip, Microfluidics, multiplexed *in vitro* platform.

# Remerciements

De tous les mensonges que les hommes se sont amusés à habiller le monde, rares sont ceux qui sont aussi petits et idiots que la tenace croyance du caractère solitaire du travail de thèse. Pour y insérer le lexique de la dramaturgie, je ne connais que peu de pièces de théâtre où s'activent tant d'acteurs exceptionnels qui, riches de la finesse de leur personnalité, ont donné corps au travail que je présente ici. Il y a, d'abord et surtout, les éternelles stars, radieuses dans toutes les pièces qui composent mon existence, des plus belles aux plus tragiques, et à qui je resterai, jusqu'à la dernière représentation, fidèle et admiratif. Ma merveilleuse mère, qui, dans son infinie tendresse, concilie dans son regard un baiser de ses yeux qui ne peut voir ceux qu'elle chérit sans les caresser passionnément du regard. Je continuerai sans cesse de chercher en moi ce qu'il y a dans ses yeux, qui m'ont vu naître, pour ne jamais la décevoir. Mon charismatique père, qui m'a transmis la sagesse de l'humour et une sociabilité sans commune mesure, que j'utilise à outrance pour m'entourer de personnes fabuleuses. Ma sœur, qui, par la puissance de sa douceur, a su m'offrir, avec Jordan et Mathis, tous ces soirs de semaine suspendus dans la tendresse quotidienne, qui resteront de précieux souvenirs de ma jeune vie d'adulte.

Sur le devant de la scène se tiennent les principaux acteurs qui ont donné toute la saveur à ce travail. Maxime Cazorla, metteur en scène, a su, avec une bienveillance exigeante et une rigueur égale à sa passion, donner forme à mes idées tout en me laissant la liberté d'expression nécessaire pour mûrir en science. Ses tirades légendaires sur l'administration resteront dans les annales, mais c'est surtout en tant que guide critique et pédagogue hors pair qu'il m'aura enseigné l'art de bien écrire et, surtout, de s'en donner les moyens. Au-delà de son mentorat, notre aventure entrepreneuriale a été un moment exceptionnel d'échange et d'apprentissage. Ces moments d'intensité, parfois accompagnés de douches froides, laissent une empreinte indélébile dans mon parcours, révélant le plaisir partagé de créer et de s'embarquer vers de nouveaux territoires.
William César, quant à lui, m'aura transmis toutes les clés nécessaires pour évoluer dans le milieu professionnel avec son humour désabusé et sa passion pour le travail bien fait. Grâce à lui, j'ai appris que la minutie, plus qu'une simple discipline, est un véritable art. Ses conseils avisés, sa vaste culture, et sa manière unique de rendre chaque tâche précise et rigoureuse ont profondément enrichi ma manière de travailler, et j'espère pouvoir, sans prétention aucune, transmettre à mon tour tout ce qu'il m'aura enseigné.

Et puis, comment ne pas mentionner ces amis, ces acteurs incroyables qui illuminent chaque acte de la pièce, apportant avec leur énergie, leur soutien et leurs éclats de rire, la substance même de l'existence. Ils ont incarné plus que des rôles indispensables, enrichissant cette aventure par leur présence inestimable. Dès l'ouverture du rideau, Cynthia et Marie, mes compagnons de scène, avec qui, à l'image de Vladimir et Estragon, nous avons tout questionné, tout traversé et fait les cent pas, jusqu'à arriver ensemble au bout du chemin. Elsa, dont l'humour piquant et toujours précis fait invariablement mouche, avec son énergie

contagieuse et son rire communicatif, aura toujours su apporter de la légèreté à chaque entrée dans l'open space. Gabrielle, érudite et fine gastronome, aura toujours autant éveillée ma curiosité que régalée mes papilles. Il y a surtout Thomas, avec qui j'ai grandi tout au long de cette représentation. Je ressens au cœur une profonde amitié quand je repense à toutes les choses belles et difficiles que nous avons affrontées ensemble. Nos infatigables monologues, nos échanges de psychologie de comptoir, et nos ruminations existentielles qui nous animent encore, jusque dans les recoins les plus reculés des vignobles du Chianti, auront, à force de refaire le monde, permis de m'y retrouver un peu mieux. J'aimerais aussi parler de Timothé et Baptiste, plus curieux l'un que l'autre, toujours inventifs et explorateurs de nouveaux outils, avec qui j'ai toujours pu partager des conversations de niche et apprendre de leur extraordinaire personnalité. Enfin, Marine, autant insolente qu'inépuisable, dont l'énergie débordante a propulsé ce travail de thèse à travers toutes les manips qu'elle a réalisées. Véritable force motrice, avec une détermination sans faille, a joué un rôle essentiel. La précieuse amitié que nous avons développée, à l'image des moments partagés et immortalisés sur ses pellicules argentiques, m'apporte de fabuleux souvenirs que j'emporterai toujours avec moi. Tous les trois, avec Mélissa, toujours animée par son idéalisme et sa tranquillité inégalable, nous avons fait vibrer la ville, $M^3$ dansant sous le ciel étoilé de Mars.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe Sonic : Eduardo, Catherine, David, Natalia, Florence, et tout particulièrement Ana, avec qui j'ai partagé tant de fous rires et de journées interminables à la paillasse, où nous nous racontions nos histoires pour rendre les heures plus légères. Vous avez tous joué un rôle essentiel dans cette aventure, et je pourrais continuer à dérouler les mots, à les assembler en un ennuyeux monologue dithyrambique soulignant l'importance de chaque acteur qui a habité la scène de ces trois années.
Cependant, pour tenter de transmettre l'essentiel, je préfère simplement exprimer le plus pur et noble de mes respects à travers la plus simple des politesses. Avec elle, j'espère avant tout vous faire ressentir l'immense poids de mes sentiments et de mon émotion à votre égard. Ce mot porte tout ce que mon manque de vocabulaire ne me permet pas d'ajouter en termes d'essence humaine, tout en étant chargé d'une immense sincérité.

Merci.

Enfin, le décor d'une pièce est tout aussi important que ses acteurs, et pour respecter le traditionnel chauvinisme marseillais, j'aimerais remercier cette ville, son peuple et la Méditerranée. De tous les fragments qui composent ma jeune existence, peu disposent de cette teinte particulière qui transforme chaque rencontre et souvenir en un moment précieux. Une teinte presque aussi belle que les reflets de l'invincible soleil d'été sur cette mer. À chaque doute, chaque tristesse, la plus vieille civilisation du monde, avec sa compréhension souriante de la nature humaine et de ses faillibilités, avec son sens du compromis et des arrangements, vint toujours me rendre le sourire.

# Table des matières

**AFFIDAVIT** ..... **2**

**1 L'ARCHITECTURE CEREBRALE** ..... **13**

1.1 Connectomique et organisation cerebrale ..... 14

*1.1.1 Théorie des graphes* ..... *14*

1.2 Exemple d'un reseau neural multimodal : Les ganglions de la base ..... 18

*1.2.1 Organisation structurelle des ganglions de la base* ..... *18*

*1.2.2 Modification de l'organisation cortico-striatale* ..... *23*

1.3 Conclusion ..... 36

**2 LES ORGANES-SUR-PUCES** ..... **38**

2.1 Les modeles *in vitro* et *in vivo* traditionnels ..... 38

*2.1.1 Systèmes in vitro* ..... *38*

2.2 Convergence de la micro-fabrication, de la microfluidique et de la biologie cellulaire ..... 44

2.3 Conceptualisation et Design ..... 48

*2.3.1 Géométrie de la culture* ..... *48*

*2.3.2 Fabrication* ..... *51*

2.4 Controle des parametres biologiques ..... 57

*2.4.1 Types cellulaires* ..... *58*

*2.4.2 Contrôle du flux* ..... *59*

*2.4.3 Intégration de biosenseurs d'analyses* ..... *61*

*2.4.4 Limites & Challenges* ..... *63*

2.5 Conclusion ..... 65

2.6 Futur des Organes-sur-puces ..... 66

*2.6.1 Rôle dans les études préclinique* ..... *66*

*2.6.2 Standardisation & Automatisation* ..... *68*

2.7 Plateformes multiplexees ..... 70

2.8 Conclusion ..... 75

**3 LES CERVEAUX-SUR-PUCES** ..... **76**

3.1 État de l'art ..... 77

*3.1.1 Microarchitecture des cerveaux-sur-puces* ..... *77*

*3.1.2 Modèles d'études biologiques* ..... *82*

3.2 Reconstruction du reseau cortico-striatal sur puce ..... 90

*3.2.1 Modélisation de pathologies affectant le système nerveux* ..... *92*

3.3 Conclusion ..... 99

**4 OBJECTIF DE LA THESE ..... 100**

**5 ÉTUDE 1 : DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DE CERVEAU SUR PUCE POUR L'ETUDE DES REORGANISATIONS TOPOGRAPHIQUE SELECTIVE AU SEIN D'UN RESEAU NEURONAL HYPEREXCITABLE ..... 102**

**6 ÉTUDE 2 : DEVELOPPEMENT D'UNE PLATEFORME DE DISTRIBUTION MICROFLUIDIQUE ET AUTOMATISE POUR LES ORGANES-SUR-PUCES ..... 129**

**8 DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION ..... 178**

**9 BIBLIOGRAPHIE ..... 194**

# Liste des figures

Figure 1 Exemple de plusieurs types de réseau simple. ..... 14
Figure 2 Description schématique de la théorie des graphes pour un réseau neuronal ..... 16
Figure 3 Schéma simplifié d'exemples d'organisation de réseau en fonction de leur relation. ..... 17
Figure 4 schéma simplifié de ganglions de la base ..... 19
Figure 5 Représentation schématique du striatum et des aires corticales projetant sur celui-ci ..... 21
Figure 6 Illustration schématique des neurones corticaux pyramidaux projettant sur le striatum ..... 22
Figure 7 Imag cortex visuel de primate au cours d'un apprentissage ..... 25
Figure 8 Plasticité des projections du réseau CS lors de l'apprentissage moteur. ..... 29
Figure 9 Altérations du circuit cortico-striatales dans la maladie de Huntington ..... 33
Figure 10 Comparaison des caractéristiques entre les cultures in vitro 2D, 3D modèles animaux.. ..... 40
Figure 11 Rôle des OoC dans la recherche biologique. ..... 46
Figure 12 Cerveaux-sur-puce unimodal et multi organes-sur-puces ..... 49
Figure 13 Exemples d'organes sur puces avec différentes organisations cellulaires de plus en plus complexe. ..... 51
Figure 14 Fabrication du moule avec le substrat en silicium et la résine SU-8 ..... 53
Figure 15 dispostif microfluidique en fabrication stratifiée ..... 55
Figure 16 Quatre aspects essentiels d'un organe-sur-puces. ..... 60
Figure 17 Différentes techniques d'analyse électrique en temps réels sur des cerveaux-sur-puces ..... 62
Figure 18 Besoins non atteins et challenges clés du développement des Organes-sur-puces. ..... 64
Figure 19 Application des Organes-sur-puces dans le pipeline de developpement médicamenteux ..... 67
Figure 20 Plateforme organes-sur-puces existantes ..... 72
Figure 21 Le cerveau est un système multi-échelle. ..... 76
Figure 22 Cerveau-sur-puce et Barrière hémato-encéphalique sur puces. ..... 79
Figure 23 Exemples de bioréacteurs ..... 80
Figure 24 Plateformes neurovasculaires sur puces. ..... 83
Figure 25 Exemples de cerveaux-sur-puces pour des études biologiques. ..... 85
Figure 26 Reconstruction de réseaux neuronaux sur puces et exemple d'unidirectionnalité des projections. ..... 88
Figure 27 Réseau multimodal unidirectionnel ..... 89
Figure 28 Reconstruction du réseau cortico-striatal sur puce. ..... 91
Figure 29 exemple de cerveau-sur-puce pour la modélisation de maladie neurodégénératives.. ..... 96
Figure 30 État des lieux des caractéristiques attendus des plateforme organes-sur-puces ..... 130
Figure 31 Différentes plateformes pour organes-sur-puces commerciales. ..... 132
Figure 32 Schéma représentatif de la plateforme MAARS ..... 134
Figure 33 Schéma de la stratégie d'interconnexion avec la puce multiplexée.. ..... 136
Figure 34 étape de l'interconnexion entre la puce PDMS et la couche d'interconnexion ..... 137
Figure 35(Haut) "équivalence" Transistor MOSFET et vanne pneumatique à membrane déformable. ..... 142
Figure 36 Tableau 02 différentes géométries de membrane testées. ..... 144
Figure 37 Tests de microvalve du module de distribution MAARS. ..... 145
Figure 38 caractérisation des microvalves. ..... 146
Figure 39 Comportements de fermeture des microvalves. ..... 148
Figure 40 Architecture fluidique théorique ..... 150
Figure 41 Prototype du module de distribution microfluidiques ..... 152
Figure 42 Utilisation détaillé du système de distribution microfluidique MAARS ..... 153
Figure 43 Synoptique de la plateforme MAARS ..... 155
Figure 44 Electronique plateforme MAARS ..... 156
Figure 45 Adressage de la puce multiplexée par les MEVs ..... 157
Figure 46 Plateforme prototype MAARS assemblée . ..... 158
Figure 47 Connecteurs standards ..... 159
Figure 48 Immunomarquage automatise sur la plateforme MAARS ..... 161
Figure 49 Schéma théorique du module de distribution standardisé. ..... 164
Figure 50 Schéma de l'architecture tri-couches standardisé du module d'adressage pneumatique. ..... 164
Figure 51 Vue éclatée de l'architecture de transmission de pression et de distribution fluidique. ..... 165

# 1 L'architecture cérébrale

Le cerveau humain, composé de plus de 86 milliards de neurones (Azevedo et al. 2009) avec plus de 180 aires corticales distinctes par hémisphère (Glasser et al. 2016), fonctionne en assemblage de réseaux neuronaux défini par des caractéristiques fonctionnelles, anatomiques, et connectomiques ( *i.e* l'ensemble des connexions entre les neurones) spécifiques qui constituent une structure d'une complexité exceptionnelle (E. Bullmore et Sporns 2009; Swanson 2011). La topographie complexe de ces réseaux a inspiré des initiatives majeures telles que le Human Connectome Project, la BRAIN Initiative, et le Blue Brain Project, toutes visant à cartographier les connexions cérébrales à grande échelle. Comprendre la cognition, l'apprentissage, et les dysfonctionnements du cerveau exige de déchiffrer le fonctionnement des réseaux neuronaux, tant au niveau des zones cérébrales spécifiques qu'à travers leurs interactions.

Ces dernières années, les avancées technologiques dans les techniques d'imagerie neuronale structurelle et fonctionnelle ont considérablement amélioré notre capacité à analyser les structures et l'activité cérébrale en temps réel. Bien que ces progrès nous rapprochent de la compréhension de la manière dont les cellules et les synapses construisent les processus mentaux et génèrent des comportements complexes, de nombreuses questions demeurent encore. La décomposition des circuits cérébraux à l'échelle cellulaire et synaptique pour l'étude des mécanismes sous-jacents à l'émergence de réseaux complexes reste un défi majeur en neurosciences. Il a longtemps été admis que seules les synapses individuelles pouvaient se remodeler, tandis que les projections axonales longues étaient considérées comme immuables. Cependant, des travaux récents ont révélé une plasticité surprenante des macro circuits cérébraux, introduisant le concept de recâblage cérébral, dans des contextes d'apprentissage ou de pathologies. Dans ce chapitre je développerai les grands principes de l'organisation architecturale des réseaux neuronaux, et plus particulièrement du réseau cortico-striatal, et je donnerai quelques exemples spécifiques de leur modification à grande échelle, en condition saine et pathologique.

## 1.1 Connectomique et organisation cérébrale

### 1.1.1 Théorie des graphes

La théorie des graphes est une branche des mathématiques qui étudie les propriétés et les applications des graphes qui est un concept fondamental pour modéliser les relations entre des objets et leurs interactions, elle est particulièrement intéressante pour étudier la connectomique en modélisant les réseaux neuronaux comme un ensemble simple de populations (neurones) et de connexions entre elles (projections axonales et synapses). Un graphe est défini comme un ensemble de sommets (ou nœuds) connectés par des arêtes (ou liens) (Figure n°1 a). Cette théorie permet d'établir des graphes complexes d'interactions comme un ensemble interconnecté qui peuvent être réels ou digitaux, et qui peuvent adopter plusieurs propriétés (Newman 2003). Les sommets peuvent être associés à un poids (représentant leur degré de connexions avec les autres sommets), et les arrêtes peuvent être orientées (représentant une relation directionnelle entre deux sommets) (figure n°1 b,c,d).

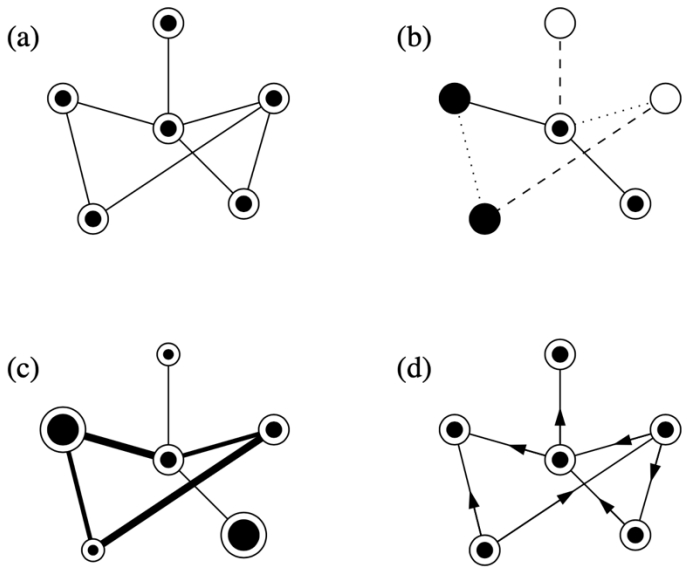



*Figure 1 Exemple de plusieurs types de réseau simple. Quatre réseaux : un unidirectionnel avec un seul type de sommets et un seul type d'arête (a), un autre avec différents types de sommets et d'arêtes (b), un avec différents poids de sommets et d'arêtes (c) et un dernier avec des arêtes directionnelles (d).*

Ainsi il n'est pas étonnant, en considérant la complexité du cerveau humain, d'utiliser la théorie des graphes pour décrire les réseaux neuronaux le composant. Par exemple, les 282 neurones du nématode *C. Elegans* ont été anatomiquement et fonctionnellement caractérisés afin d'identifier chaque neurone et leurs connexions synaptiques. En utilisant la

théorie des graphes, les neurones ont été représentés par des sommets et chaque connexion synaptique entre eux par des arrêtes. Ceci a permis d'établir grâce à la théorie des graphes la connectomique complète du système nerveux du nématode *C. Elegans* afin d'étudier précisément les relations fonctions-structures de l'ensemble du réseau (White 1986).

La reconstruction de réseaux neuronaux de plus grande échelle comme le cerveau humain fait l'objet de nombreuses recherches (Olaf Sporns 2002; O. Sporns 2000). Pour reconstruire structurellement et fonctionnellement les réseaux neuronaux la première étape consiste évidemment à recueillir un grand nombre de données. Pour ce faire, chez l'humain, plusieurs techniques sont utilisées conjointement. Les populations neuronales d'intérêts, les sommets, peuvent être aux choix définies anatomiquement sur coupe histologique ou par imagerie par tenseur de diffusion (Iturria-Medina et al. 2007)(Étape 1,2 Figure n°2). De même les projections neuronales, les arrêtes, peuvent être étudiées sur coupe anatomique pour établir une organisation structurelle du réseau.

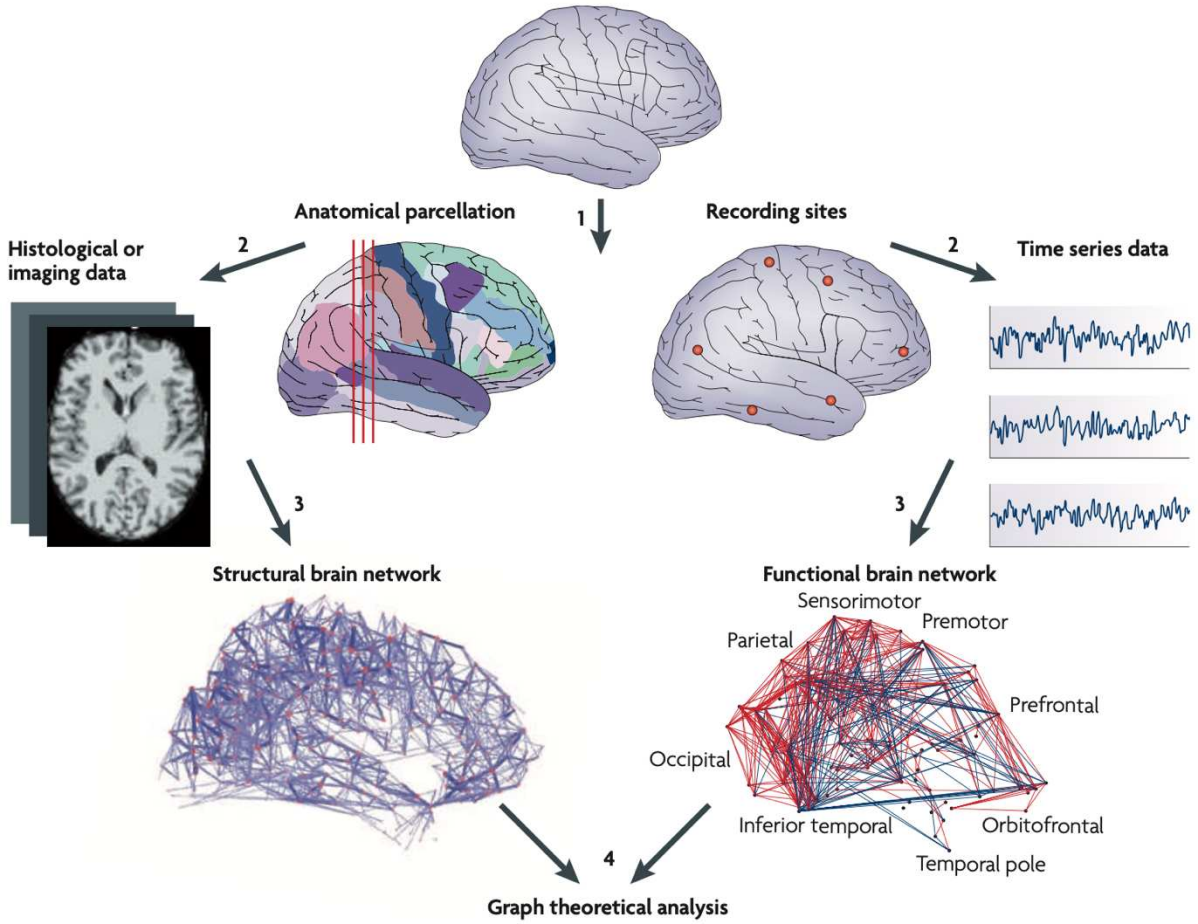


*Figure 2 Description schématique de la méthode pour utiliser la théorie des graphes afin de décrire la topographie d'un réseau neuronal d'intérêt dans le cerveau humain. Tirée de (E. Bullmore et Sporns 2009).*

En parallèle, l'organisation fonctionnelle est quant à elle reconstruite en mesurant le degré d'association entre les sommets en utilisant des techniques d'imagerie comme la résonance magnétique fonctionnelle (Barabási et Albert 1999), qui mesure les variations du flux sanguins associées à l'activité neuronale, permettant de détecter quelles régions du cerveau sont actives lors de tâches spécifiques. L'électroencéphalographie et la magnétoencéphalographie qui mesurent l'activité électrique ou les champs magnétiques générés par les neurones en temps réel permettant de suivre les interactions rapides entre différentes zones du cerveau. Et, enfin, les matrices de microélectrodes qui fournissent des informations précises à l'échelle locale sur les connexions synaptiques dans un réseau (étape 3 Figure n°2). L'assemblage des données obtenues pour l'établissement structurel et fonctionnel du réseau permet par la théorie des graphes de reconstruire le réseau cérébral étudié où chaque population de neurone est modélisé comme un sommet dans le graphe et les connexions synaptiques sont représentées par des arêtes connectant spécifiquement les sommets (étape 4 Figure n°2).

Le cerveau est intrinsèquement un réseau directionnel avec des sommets associés à des poids (Oldham et Fornito 2019). Effectivement, chaque population neuronale projette vers et/ou reçoit une certaine quantité de projection. Le poids, la centralité, ou le degré d'un sommet est associé communément à la quantité de connexion que la population neuronale reçoit (la somme de tous ses afférents). La construction des réseaux neuronaux en utilisant la théorie des graphes a ainsi permis de comprendre que les aires corticales des mammifères sont connectées entre elles d'une manière ni strictement stochastique ni strictement régulière et systématique (Sporns et al. 2004). A contrario, l'organisation complexe des réseaux neuronaux (Figure n°3) est le résultat d'un compromis entre le coût métabolique dans l'établissement des structures qui doit tendre vers le minimum et le besoin d'interconnexion complexe pour assurer la fonctionnalité de l'ensemble (E. Bullmore et Sporns 2012).

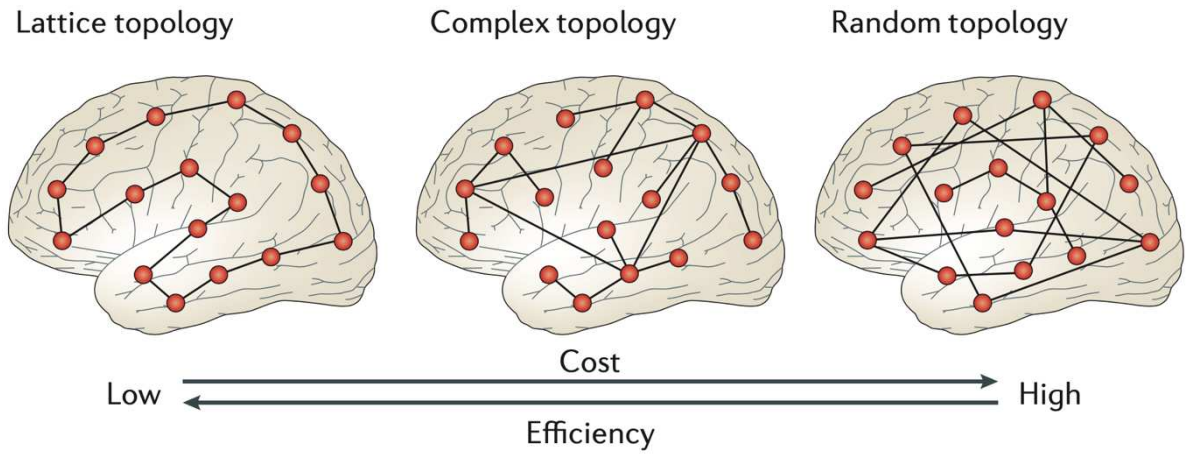



*Figure 3 Schéma simplifié représentant des exemples d'organisation de réseau en fonction de leur relation coût-efficacité. Les réseaux neuronaux assurent leur fonctionnalité en maximisant l'efficacité tout en minimisant le coût de la structure. Tiré de (E. Bullmore et Sporns 2012).*

Ceci se traduit par l'émergence de regroupement de populations neuronales proches, désigné par le terme :« Small world topology », qui forment des nœuds centraux « hubs » connectés entre eux par de plus longues connexions formant un ensemble fonctionnel précis (sensoriel, moteur, etc). Je resterai volontairement en surface des subtilités spécifiques des réseaux neuronaux pour ne pas égarer le propos. L'essentiel est de comprendre, par la distribution complexe des connexions du cerveau, que les « hubs » jouent un rôle fondamental dans les fonctions cérébrales (Van Den Heuvel et Sporns 2013). Les « hubs » impliqués dans le plus grand nombre de tâches cognitives sont, dans le cerveau adulte, localisés dans le cortex associatif, les ganglions de la base et le thalamus. Ils peuvent être détectés dès 18-22 semaines de gestation dans le fœtus humain en développement et ils évoluent jusqu'à l'âge adulte (S. K. McConnell, Ghosh, et Shatz 1989; S. McConnell, Ghosh, et Shatz 1994; Supèr, Soriano, et Uylings 1998; Tau et Peterson 2010). Après la naissance, les circuits cortico-striatal, cortico-hippocampal et meso-cortical gagnent en organisation et en spécificité. C'est durant cette période critique que de nombreux paramètres comme des anomalies génétiques, l'exposition à de nombreuses molécules (médicaments, drogues) ou des facteurs exogènes (stress maternel, infection, malnutrition) peuvent altérer la formation des réseaux neuronaux (Kostovic 2002). Ainsi les perturbations, modifications ou changements anormaux dans l'organisation des « hubs » sont associés à de nombreuses neuropathologies et maladies psychiatriques (Bassett et Bullmore 2009; Fornito et Bullmore 2010; Crossley et al. 2014), comme le trouble du spectre de l'autisme (TSA) (Courchesne 1997; Nair et al. 2013), ou la

schizophrénie (Rubinov et Bullmore 2013) avec des déficits dans l'organisation des réseaux cortico-cortical, cortico-thalamique ainsi que le réseau cortico-striatal. Enfin, à l'âge adulte avec des réseaux neuronaux correctement formé, des anomalies génétiques ou des maladies neurodégénératives peuvent venir endommager les réseaux neuronaux. Par exemple, la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer modifient de manière anormale un certain nombre de réseaux en perturbant leur fonctionnement à différents niveaux. Cela peut inclure un ensemble de phénomènes tels que la dégénérescence neuronale, une plasticité synaptique altérée, une modification de balance excitation/inhibition qui affecte la structure et la fonction des réseaux neuronaux. Toutes ces maladies engagent le réseau cortico-striatal et les ganglions de la base.

Ainsi il est nécessaire de nous intéresser au réseau Cortico-Striatal qui semble essentiel pour comprendre la formation d'un certain nombre de fonctions cognitives ainsi que son rôle dans les neuropathologies.

## 1.2 Exemple d'un réseau neural multimodal : Les ganglions de la base

Les ganglions de la base sont des structures cérébrales profondes qui orchestrent et permettent l'exécution de nombreuses fonctions motrices en coordonnant les mouvements volontaires et en facilitant l'initiation et la fluidité des gestes (Graybiel 1995). En plus de leur rôle moteur, ces structures interviennent dans diverses fonction cognitives, telles que la planification, la prise de décision et l'organisation des actions (Packard et Knowlton 2002). Ils jouent également un rôle clé dans la perception de la récompense et le renforcement des comportements en régulant les circuits de motivation et en influençant les comportements dirigés vers des objectifs (Wise 1996; Schultz 1997). Enfin, ils sont essentiels dans le développement des habitudes et des comportements addictifs, en modifiant les réponses comportementales aux expériences répétées (Haber 2016) ainsi que dans l'apprentissage procédural et la mémoire, qui permettent d'automatiser les compétences au fil du temps.

### 1.2.1 Organisation structurelle des ganglions de la base

Les ganglions de la base sont composés de plusieurs structures : le striatum (noyau principal d'entrée des informations dans le réseau) , le globus pallidus (divisé en noyau interne et externe, et recevant des projections striatales formant respectivement la voie directe et

indirecte), le noyau sous-thalamique et la substance noire (divisée en noyau réticulé SNr et compact SNc). Les principaux afférents des ganglions de la base proviennent des neurones glutamatergiques du cortex cérébral et des noyaux intralaminaires du thalamus, ainsi que des neurones dopaminergiques de la substance noire réticulée, qui projettent principalement sur le striatum, principale structure d'entrée du réseau. Ce réseau reçoit également des afférences glutamatergiques de l'amygdale (Kelley, Domesick, et Nauta 1982) et de l'hippocampe (Puighermanal et al. 2021) (Figure n°4).

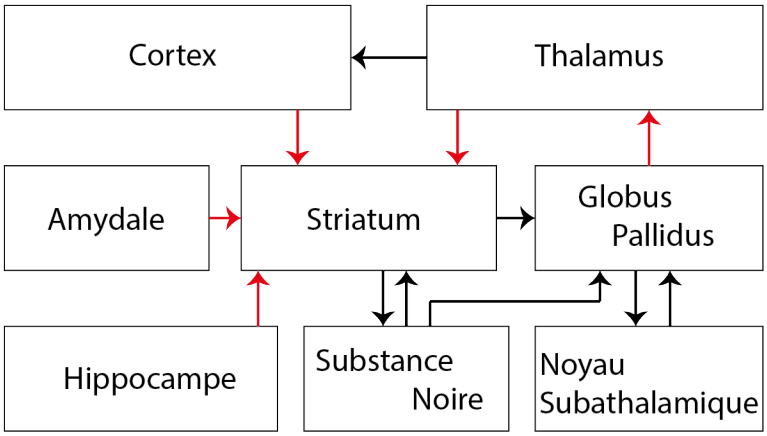



*Figure 4 Schéma simplifié des ganglions de la base (Striatum, Globus Pallidus, Substance Noire, Noyau subthalamique) et des principales structures envoyant des projections (flèches rouges). Les voies directe et indirecte ne sont volontairement pas détaillées ici.*

Les ganglions de la base reçoivent une innervation glutamatergique excitatrice massive des aires corticales, qui sont ensuite traitées par les GB et transmises au thalamus et dans le tronc cérébral par la substance noire ou le Globus pallidus. Le thalamus projette, en retour, sur le cortex cérébral via une transmission GABAergique formant une boucle cortico-GB-thalamo-corticale. Cette boucle excitatrice/inhibitrice est à la base du fonctionnement des GB. La libération de dopamine, neuromodulateur sécrété par la Subs noire compacte assure le bon fonctionnement du réseau en régulant finement l'état global du circuit. L'anatomie, la physiologie et les fonctions des ganglions de la base restant complexes je m'intéresserai dans ce chapitre simplement au circuit cortico-striatal qui constitue la principale entrée des ganglions de la base sur le striatum et qui concerne plus particulièrement mon travail de thèse.

Les connexions cortico-striatales sont cruciales dans le développement adéquat de la motivation, la cognition, les émotions, et les compétences motrices. Chaque zone corticale

envoie des projections descendantes qui innervent les structures sous-corticales et le striatum. Les projections cortico-striatales sont organisées hiérarchiquement et ordonnées en série, suivant une architecture topographique complexe et précise, connue pour être essentielle à la transduction, l'intégration et le traitement de l'information corticale au sein des ganglions de la base (Graybiel 2008; Parent et Hazrati 1995; Alexander, DeLong, et Strick 1986). Les études anatomiques menées sur diverses espèces, y compris les primates et les rongeurs, ont systématiquement démontré la présence de voies cortico-striatales organisées de manière topographique, avec des zones spécifiques du cortex projetant vers des zones spécifiques du striatum. À certaines frontières entre ces zones de projection, il existe des points de convergence où les informations de différentes régions du cortex sont intégrées (Figure n°5) (Hintiryan et al. 2016; Flaherty et Graybiel 1991; Berendse, Graaf, et Groenewegen 1992; Mailly et al. 2013; Averbeck et al. 2014).

Le striatum, structure la plus volumineuse des ganglions de la base, est aussi le site majeur d'intégration des informations en provenance du cortex cérébral, du thalamus et de l'hippocampe . Il projette ensuite à son tour sur la substance noire, le complexe (interne et externe) du globus pallidus (Haber 2003). Chez le primate le striatum est composé du Putamen, du noyau caudé et du noyau accumbens. Le striatum reçoit des projections de toutes les aires corticales, dont le cortex préfrontal. Cette aire corticale est divisée en plusieurs régions fonctionnelles distinctes : le cortex préfrontal orbital et médial (OMPFC), impliqué dans la gestion des émotions et de la motivation ; le cortex préfrontal dorsolatéral (DLPFC), impliqué dans les fonctions planification stratégique et la mémoire de travail ; et les aires corticales prémoteur et moteur, qui contrôlent de manière hiérarchique le mouvement de la planification à sa réalisation. Les projections qu'elles envoient sont topographiquement et fonctionnellement organisées, le DLPFC projette densément sur le striatum rostral à la fois dans le putamen et le noyau caudé avec peu projections dans les parties centrales et caudale du striatum (Selemon et Goldman-Rakic 1985). Le OMPFC projette lui aussi sur le striatum rostral mais beaucoup plus sur le noyau accumbens et sur la coquille du striatum ventral. Enfin, les aires moteur et prémoteur elles, projettent beaucoup plus dans la partie caudale du striatum, massivement sur le putamen dorsolatéral et caudal. Sans rentrer dans l'organisation anatomique précise de chaque aire corticale sur chaque sous région du striatum, les projections du cortex frontal forment un 'gradient d'entrées' depuis le secteur ventromédian

jusqu'au striatum dorsolatéral, avec le cortex préfrontal médial et orbital se terminant dans la partie ventromédiane, et le cortex moteur se terminant dans la région dorsolatérale (Figure n°5, C).

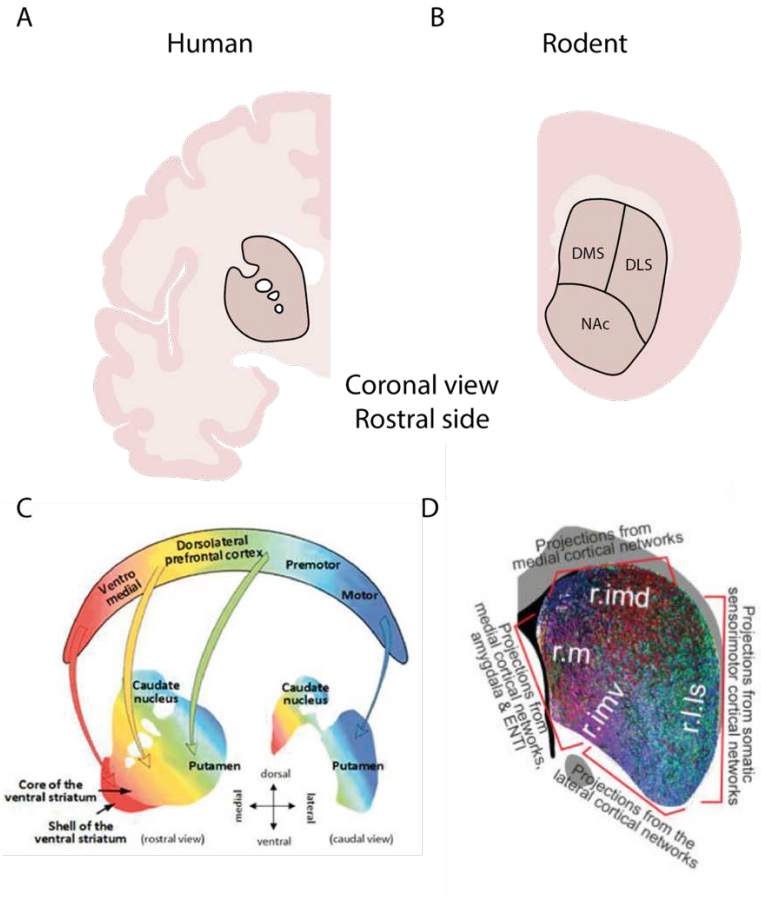



*Figure 5 Représentation schématique du striatum et des aires corticales projetant sur celui-ci chez l'humain et le rongeur. Coupe coronale avec une vue rostrale du striatum chez l'humain et le rongeur (A, B). Chez le rongeur, le striatum est subdivisé en striatum dorsolatéral (DLS), dorsomédian (DMS) et noyau accumbens (Nac) (B). Schéma simplifié de l'organisation topographique des projections des différentes aires du cortex préfrontal sur le striatum humain (C) et rongeur (D). Adapté de (Ersche et al. 2020) et (Hintiryan et al. 2016).*

Chez le rongeur le striatum peut ainsi être subdivisé en striatum dorsolatéral (DLS) correspondant au putamen chez le primate et en striatum dorsomédian (DMS) correspondant au noyau caudé chez le primate (Figure n°5, B). Le DLS intervient principalement dans le contrôle des habitudes motrices et des comportements automatiques (Yin et Knowlton 2006; Balleine et O'Doherty 2010; Graybiel 2008). Il est aussi souvent associé à l'apprentissage procédural. Le DMS est plus impliqué dans le contrôle cognitif et flexible des comportements. Il joue un rôle dans la prise de décision, en particulier dans les situations ou un comportement doit être adapté en réponse à un stimuli. Il est aussi crucial dans les comportements orientés

vers un but et l'apprentissage spatial (Devan et White 1999). Ces deux régions reçoivent des projections distinctes de différentes régions du cortex et la topographie de cette connectivité est essentielle pour le bon fonctionnement des fonctions associées au réseau. Le DLS reçoit principalement des projections du cortex sensorimoteur, incluant les aires motrices primaires (M1) et les aires somatosensorielles (Figure n°5, D), expliquant la forte implication du DLS dans le contrôle des mouvements et des habitudes motrices. Le DMS lui reçoit principalement des projections du cortex préfrontal, en particulier des régions associées à la prise de décision et à la flexibilité cognitive. Il reçoit aussi des projections du réseau cortical médial impliqué dans l'intégration sensorielle et la navigation spatiale (Figure n°5, D). Ainsi le DMS intègre un grand nombre d'informations complexes provenant de plusieurs régions corticales pour influencer des comportements lors de prise de décision particulièrement dans des contextes d'évaluation de récompense.

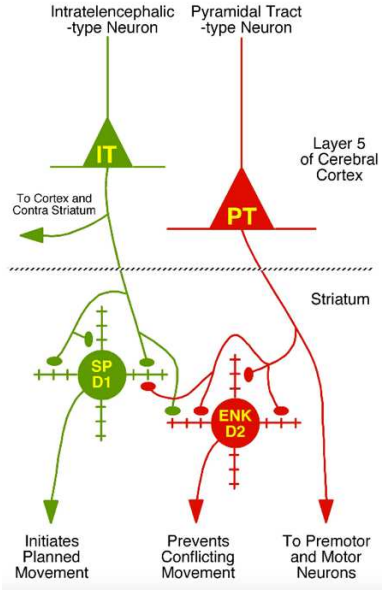



*Figure 6 Illustration schématique des neurones corticaux pyramidaux de la couche 5 projetant sur les sous-types neuronaux du striatum. Tirée de (Reiner 2010)*

Succinctement, si nous rentrons un peu plus précisément dans la structure des projections cortico-striatales nous pouvons, premièrement, classifier en deux groupes les neurones pyramidaux corticaux de la couche 3 et 5 excitateurs qui projettent sur le striatum ; les neurones intra encéphalique (IT) et les neurones du faisceau pyramidal (PT) (Shepherd 2013). Les neurones IT projettent de manière bilatérale sur le striatum tandis que les neurones PT projettent uniquement ipsilatéralement. Deuxièmement, les cibles de ces

neurones corticaux sont différentes, ils projettent tous deux sur les neurones de projections épineux du striatum (SPN). Les SPN sont eux aussi classifiés en deux sous-groupes distincts ; les SPN de la voie directe qui expriment les récepteurs dopaminergiques D1 et qui projettent sur le GP interne et la substance noire réticulée, et les SPN de la voie indirecte qui expriment les récepteurs dopaminergiques D2 et qui projettent à leur tour sur le GP externe (Figure n°6).

Cette organisation topographique et anatomique précise des projections cortico-striatales tant à l'échelle du réseau que celle des spécificités cellulaires associées à un ensemble de fonctions cognitives permet de comprendre que des modifications de ce réseau peuvent avoir de grandes conséquences sur les fonctions associées aux GB.

### 1.2.2 Modification de l'organisation cortico-striatale

Tout au long du développement et de la vie d'adulte, le cerveau et ses réseaux se modifient de manière dynamique. La plasticité neuronale, définie comme la capacité du système nerveux à adopter un nouvel état fonctionnel ou structurel en réponse à l'expérience, à l'apprentissage ou aux états pathologiques, est le mécanisme principal de l'évolution des réseaux neuronaux. La plasticité neuronale se manifeste à plusieurs échelles ; l'échelle macroscopique par des changements dans le modèle structurel et fonctionnel des différentes régions cérébrales, à une échelle mésoscopique par des modifications des connexions à longue distance et locales entre différents types de neurones, et à une échelle microscopique par l'évolution des connexions synaptiques. Une altération de la plasticité neuronale peut être à l'origine de nombreux troubles cérébraux développementaux, acquis ou neurodégénératifs. Avant de nous intéresser spécifiquement aux modifications de l'organisation cortico-striatale, détaillons la plasticité de l'axone aux différentes échelles évoquées.

#### *1.2.2.1 Plasticité microscopique : remodelage des connexions synaptiques*

La plasticité microscopique concerne les changements au niveau des synapses, c'est-à-dire les connexions entre neurones. Cela inclut des phénomènes comme la potentialisation à long terme (LTP), qui renforce la connexion entre deux neurones lorsqu'ils sont activés de manière répétée, et la dépression à long terme (LTD), qui affaiblit cette connexion en réponse à une absence de stimulation ou une stimulation prolongée. Ces processus sont essentiels

pour moduler la force des connexions synaptiques au sein d'un réseau (Malenka et Nicoll 1993; Katz et Shatz 1996; Ganguly et Lee 2013).

L'activité neuronale, jouant un rôle homéostatique, est un des acteurs clés qui régule la compétition synaptique. Il a été observé, lors du neurodéveloppement, que l'hyperactivation de neurones hippocampiques *in vitro*, via l'expression d'une mutation du canal potassique Kir2.1, diminue le nombre de synapses formées (Burrone, O'Byrne, et Murthy 2002). Dans les réseaux matures, l'application d'un pattern d'activation à haute fréquence sur des tranches d'hippocampe résulte en une diminution du nombre de boutons synaptiques après 2 heures (Bourne, Chirillo, et Harris 2013). Ainsi, la plasticité synaptique pourrait être décrite comme une formation rapide et aberrante de contacts synaptiques immatures qui sont ensuite sélectivement éliminés ou consolidés par l'activité neuronale.

#### *1.2.2.2 Plasticité mésoscopique : remodelage de l'axone*

La plasticité mésoscopique implique des changements dans des circuits neuronaux spécifiques ou des réseaux de neurones. Elle englobe des processus tels que le remodelage des circuits neuronaux et la réorganisation des connexions au sein d'une région cérébrale ou entre différentes régions du cerveau. Le neurone est une cellule polarisée, composée de son corps cellulaire, de ses dendrites et d'un axone unique (Craig et Banker 1994). Cette polarité induit une propagation unidirectionnelle de l'information, où celle-ci est reçue par les dendrites, tandis que l'axone initie et transmet les signaux électriques. L'axone se connecte à de multiples dendrites dans les populations cibles via des synapses, formant ainsi des réseaux complexes.

L'axone est composé de trois segments distincts. Le premier, au niveau proximal de l'axone, est le segment initial de l'axone (AIS), qui contient un grand nombre de canaux ioniques et est responsable de l'initiation des potentiels d'action (Kole et al. 2008). Cependant, nous ne détaillerons pas ce segment dans ce sous-chapitre, nous concentrant plutôt sur les deux autres segments impliqués dans la plasticité axonale : l'axone distal et médial.

L'axone distal est la partie terminale de l'axone, composée de branches stables et de branches dynamiques qui évoluent en réponse à des apprentissages ou à des privations. Par exemple, *Marik et al.* (Marik et al. 2010) ont montré, en effectuant l'ablation des moustaches de souris, une évolution dynamique et rapide des connexions axonales dans le cortex somatosensoriel

en tonneau, spécialisé dans le traitement sensoriel des informations provenant des vibrisses. Les zones correspondant aux vibrisses absentes présentent une réduction des branches axonales excitatrices directes.

Dans une autre étude chez les primates, *Van Kerkoerle et al.* (Van Kerkoerle et al. 2018) ont observé, après un apprentissage visuel de 8 semaines, une réorganisation massive des branches collatérales préexistantes dans le cortex visuel des singes (Figure n°7 A,B). Cette dynamique de branches implique également un renouvellement des boutons synaptiques, reflétant la plasticité continue des circuits neuronaux dans l'adaptation à de nouvelles expériences. Cette plasticité mésoscopique démontre ainsi la capacité des réseaux axonaux à se remodeler en fonction des stimuli environnementaux, contribuant à la réorganisation fonctionnelle des circuits neuronaux.

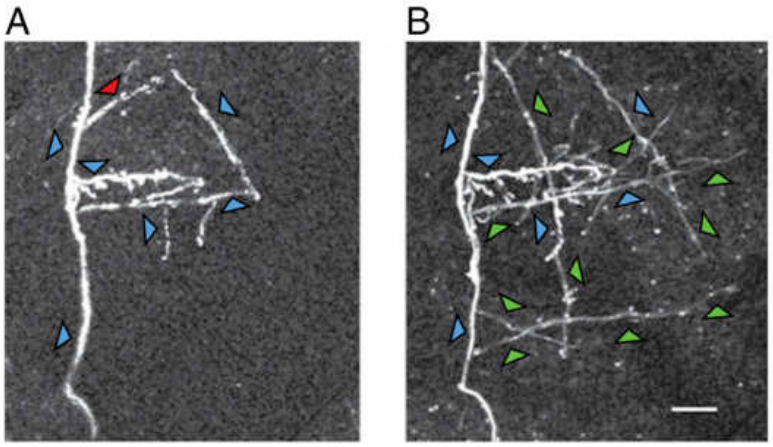



*Figure 7 Image réalisée avec un microscope deux-photons d'une même région du cortex visuel de primate : (A) lors de l'apprentissage et (B) huit semaines après l'apprentissage. Les axones qui se sont rétractés sont représentés par des flèches rouges, les axones stables par des flèches bleues et la naissance de branches collatérales par des flèches vertes. Adaptée de Van (Kerkoerle, 2018).*

La morphologie de l'axone médial est modifiée en réponse à l'activité neuronale par, entre autres, un élargissement de son diamètre permettant une augmentation la vitesse de conduction des potentiels d'actions (Chéreau et al. 2017). De plus l'activité neuronale active aussi les oligodendrocytes et affecte la myélinisation des axones en augmentant la prolifération des cellules précurseurs des oligodendroctyes et l'épaisseur de la gaine de myéline.

Il apparaît donc clairement que l'axone évolue de manière dynamique pendant le développement. À l'âge adulte, malgré une certaine stabilité des axones pour le maintien des réseaux neuronaux établis, une plasticité des branches terminales et des axones persiste,

permettant une réorganisation structurelle et fonctionnelle en réponse aux apprentissages, aux expériences, et aux pathologies. Cette capacité d'adaptation continue des axones contribue ainsi à la plasticité des réseaux neuronaux, même après la période de développement initiale.

#### *1.2.2.1 Plasticité macroscopique : remodelage des circuits cérébraux*

La plasticité macroscopique concerne les changements à grande échelle entre des régions spécifiques dans le cerveau entier, observables par des techniques d'imagerie cérébrale comme l'Imagerie à résonance magnétique. Cela inclut des phénomènes tels que la réorganisation fonctionnelle de grandes aires cérébrales après un traumatisme, ou des modifications de l'activité cérébrale pour donner suite à l'apprentissage ou à l'expérience.

À l'échelle d'une population neuronale, il a été montré qu'un remodelage topographique se produit dans les aires corticales motrices et sensorielles en réponse à des expériences, comme l'apprentissage d'un instrument de musique. Par exemple, *Draganski et al.* (Draganski et al. 2004) ont montré que l'apprentissage de nouveaux mouvements, tel que jouer du piano, induit des modifications structurelles dans le cerveau, avec une augmentation de la densité de matière grise dans des régions corticales liées à l'apprentissage moteur. De plus, *Marik et al.* (Marik et al. 2010) ont montré que dans le cortex somatosensoriel en tonneaux, suite à l'ablation de vibrisses chez la souris, des projections collatérales excitatrices provenant des zones non affectées se forment dans la région dégénérée, tandis que des collatérales inhibitrices sont projetées vers ces mêmes zones. Cela suggère une perte de la topographie des projections dans le cortex en tonneaux, révélant une plasticité marquée à l'échelle d'une population neuronale.

Cette plasticité est particulièrement évidente lors du neurodéveloppement, où elle permet l'établissement et la stabilisation des réseaux neuronaux. Cependant, elle persiste également dans le cerveau adulte mature. Par exemple, une étude de *Pienkowski et al.* (Pienkowski et Eggermont 2011) a montré que l'organisation tonotopique (c'est-à-dire la carte des fréquences sonores dans le cortex auditif) évolue à la fois chez les animaux jeunes et adultes, avec des changements à grande échelle dans la représentation corticale des fréquences à la suite d'une exposition prolongée à certains sons. De plus, la plasticité structurelle et fonctionnelle dans le cerveau adulte est également impliquée dans les processus d'apprentissage déclaratif et procédural, comme l'ont montré *Hubener et Bonhoeffer*

(Hübener et Bonhoeffer 2010), soulignant l'importance de cette plasticité pour l'adaptation cognitive tout au long de la vie.

À l'échelle macroscopique, les techniques d'imagerie telles que l'IRM de diffusion (DTI), qui permet de cartographier les fibres de substance blanche, sont particulièrement utiles pour observer cette plasticité. Une étude de Bengtsson et al. (Bengtsson et al. 2005) a mis en évidence une plasticité de la matière blanche chez des enfants et des adultes pratiquant le piano, révélant une augmentation du volume de cette matière suite à la pratique prolongée de l'instrument. Cette augmentation pourrait être liée à un épaississement de la myélinisation des axones impliqués dans l'apprentissage musical, permettant une transmission plus rapide et plus efficace des signaux neuronaux. Cela démontre que la plasticité n'est pas uniquement synaptique, mais s'étend également à la structure des connexions axonales à l'échelle du cerveau entier.

Ces découvertes illustrent comment la plasticité macroscopique permet au cerveau de s'adapter non seulement aux changements environnementaux, mais aussi aux apprentissages, en remodelant ses connexions à grande échelle.

#### 1.2.2.2 Cas particulier du réseau cortico-striatal : modifications structurelles et fonctionnelles lors de l'apprentissage moteur

L'acquisition de compétences motrices est le processus au cours duquel les mouvements, effectués seuls ou en séquence, viennent à être exécutés de manière automatique sans effort grâce à une pratique régulière et répétée. Ces compétences sont utilisées quotidiennement (comme la possibilité de saisir des petits objets), et sont importantes (comme par exemple, la pratique d'un instrument de musique ou d'un sport). L'étude de l'apprentissage de ses comportements ont été étudiés selon deux protocoles d'expériences ; La mesure de l'acquisition incrémentielle de séquences motrices jusqu'à ce qu'elles deviennent un comportement bien exécuté ou la capacité d'un individu à compenser des perturbations et a adapté un comportement moteur particulier face à des changements.

Le processus d'apprentissage d'une compétence se décompose en plusieurs étapes. La première se compose d'un apprentissage extrêmement rapide, dans laquelle des améliorations considérables sont mesurées au cours d'une seule session d'entrainement. Deuxièmement une phase lente, dans laquelle les améliorations supplémentaires s'observent sur plusieurs sessions d'entrainements. Troisièmement, la phase de consolidation, ou après

une période latente, des améliorations spontanées peuvent être observées sans pratique supplémentaire après la première session. Quatrièmement, la phase automatique dans laquelle la compétence nécessite des ressources cognitives minimales. Enfin, cinquièmement, une phase où les performances deviennent persistantes au cours du temps sans nécessité de pratique (Doyon et Benali 2005).

Deux réseaux neuronaux sont majeurs dans l'ensemble des étapes de l'acquisition et de la consolidation des compétences motrices ; Le réseau cortico-striatal et cortico-cerebelleux dans la première phase d'apprentissage les deux réseaux sont activés, néanmoins une fois que la compétence motrice évolue vers les dernières étapes de l'apprentissage, seulement un des deux réseaux s'active. Le réseau cortico-striatal est crucial pour la consolidation et le maintien à long terme d'une séquence motrice alors que le réseau cortico-cerebelleux lui et spécialisé dans le maintien de l'adaptation particulière d'une compétence motrice (Doyon et Benali 2005). Des études se sont intéressées à la plasticité du réseau cortico-striatal. Notamment, *Bureau et al.* (Bureau et al. 2010) se sont intéressés aux changements synaptiques des projections du cortex moteur sur le striatum dorsal lors de la phase d'apprentissage du rotarod. Ils ont mis en avant le rôle de la kinase régulée par le signal extracellulaire ERK 1/2 (qui joue, entre autres, un rôle dans la plasticité synaptique) dans la phase de consolidation de l'apprentissage des compétences motrices. Les résultats clés montrent que la phosphorylation d'ERK 1/2 dans le striatum dorsal est cruciale pour la consolidation de la mémoire motrice pendant l'apprentissage de la tâche du rotarod. Les chercheurs ont administré deux inhibiteurs d'ERK (SL327 de manière systémique et PD98059 directement dans le striatum dorsal). Les deux inhibiteurs ont altéré la performance motrice, mais uniquement pendant la phase de consolidation, indiquant que l'activité d'ERK dans le striatum dorsal est essentielle pour stabiliser les mémoires motrices plutôt que pour les acquérir. Cette étude est donc indirectement liée à la plasticité du circuit cortico-striatal au niveau de sa plasticité synaptique. Dans la même idée une étude (Gremel et Costa 2013) explore les mécanismes neuronaux responsables de la transition entre les comportements dirigés par des objectifs et les actions habituelles, en mettant l'accent sur le rôle du cortex orbitofrontal et du DMS et DLS**.** Cette étude démontre que ces régions du cerveau sont différemment engagées selon que l'action est orientée vers un but ou devient une habitude. Le DMS et le cortex orbitofrontal sont davantage impliqués dans les comportements dirigés par des

objectifs, tandis que le DLS est plus actif lors d'actions automatisées et habituelles. Grâce à des enregistrements simultanés des activités neuronales dans ces régions, les chercheurs ont montré que les mêmes neurones peuvent afficher des schémas d'activation distincts selon le type d'action. Cette modulation dynamique révèle une plasticité au sein du réseau cortico-striatal, permettant une flexibilité comportementale en fonction de la valeur des résultats obtenus. Cette plasticité est cruciale pour l'adaptation des comportements en fonction des changements environnementaux, en réorganisant l'activité du DMS et du DLS pour permettre la bascule entre des actions flexibles et des actions routinières. L'implication majeure de cette étude est qu'elle souligne comment le réseau cortico-striatal utilise cette plasticité pour ajuster continuellement les stratégies comportementales, un processus essentiel pour la prise de décision et l'adaptation aux nouvelles contingences.

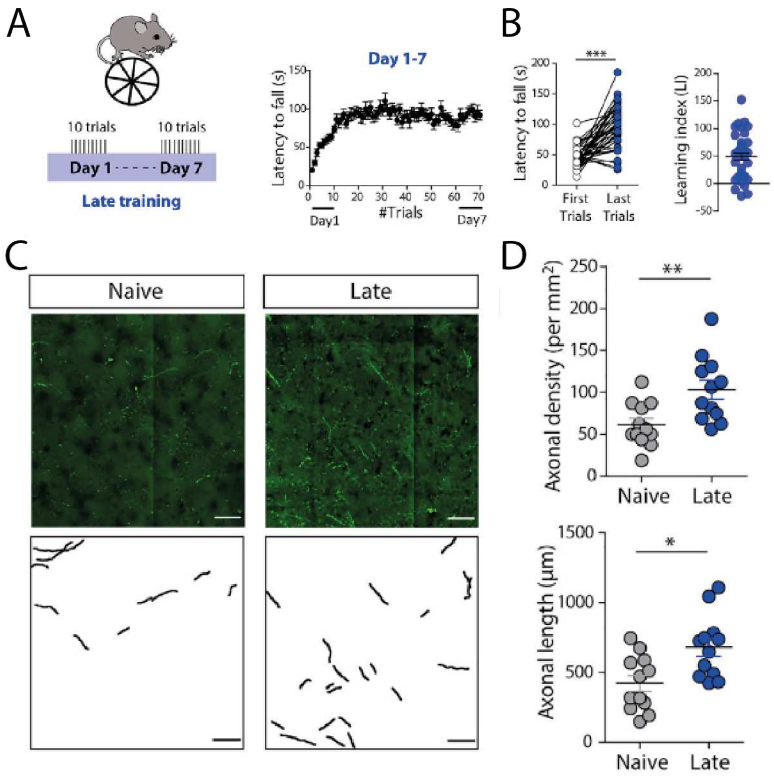



*Figure 8 Plasticité des projections du réseau CS lors de l'apprentissage moteur. (A) Entraînement sur rotarod pendant 7 jours avec 10 essais par jour. (B) Le temps de latence avant la chute augmente entre le premier (points blancs) et le dernier entraînement (points bleus). (C) Image en microscopie confocale réalisée dans le DLS montrant des axones corticaux exprimant la GFP entre un animal naïf et entraîné. (D) Densité axonale et longueur des axones corticaux mesurées dans le striatum entre un animal naïf (gris) et un animal entraîné (bleu). Adaptée de Badreddine et al., 2022.*

Si nous nous intéressons à une plasticité structurelle à plus grande échelle au-delà de la plasticité synaptique. Dans une étude de *Badreddine et al. (Badreddine et al. 2022)* des souris ont été entrainées sur rotarod, un appareil pour l'apprentissage moteur chez les rongeurs (Figure n°8 A,B), afin d'étudier la réorganisation du réseau cortico-striatal. Les auteurs de l'étude montrent que l'apprentissage moteur induit une réorganisation spécifique des réseaux neuronaux dans le DMS et le DLS. Le DMS présente une diminution de l'activité globale au début de l'entraînement, tandis que le DLS forme progressivement des clusters de cellules hautement actives (HA) à mesure que l'apprentissage se consolide, ce qui est corrélé à la rétention des compétences motrices. L'étude identifie à la fois une plasticité synaptique et une plasticité anatomique dans le cheminement cortico-striatal. Le DMS subit des modifications synaptiques en réponse aux entrées corticales, alors que le DLS subit un remodelage anatomique à long terme, avec une augmentation de la densité des projections corticales vers le DLS après un apprentissage moteur intensif (Figure n°8 C,D). Cette plasticité anatomique comprend une densité accrue des axones dans les projections cortico-striatales, ce qui suggère que les changements structurels jouent un rôle clé dans la consolidation des compétences motrices.

Le réseau cortico-striatal démontre donc une plasticité à plusieurs échelles, jouant un rôle central dans l'adaptation et l'acquisition de compétences. À l'échelle synaptique, des modifications dans la force des connexions neuronales permettent une flexibilité comportementale immédiate, essentielle à l'apprentissage. À une échelle plus large, la plasticité anatomique se manifeste par des réorganisations structurelles, telles que l'augmentation de la densité des projections axonales, particulièrement dans le striatum dorsolatéral, ce qui contribue à la consolidation à long terme des comportements appris. Enfin, au niveau du réseau fonctionnel, l'activation des régions du cortex et du striatum varie selon les besoins de la tâche, permettant une transition entre des comportements dirigés par des objectifs et des actions automatisées. Ainsi, la plasticité du réseau cortico-striatal intègre ces trois niveaux, garantissant une adaptation efficace aux nouvelles expériences et aux demandes environnementales. Nous allons maintenant examiner comment cette plasticité est altérée dans des contextes pathologiques, afin de mieux comprendre les dysfonctionnements pouvant sous-tendre certains troubles neurologiques et psychiatriques.

#### 1.2.2.3 Modification du réseau cortico-striatal en condition pathologique

Comme nous le disions dans l'organisation des ganglions de la base, les projections corticales sont fonctionnellement séparées en boucles parallèles cortico-ganglions de la base-thalamo-corticales, chacune étant dédiée à la transmission et à l'intégration de types spécifiques d'informations (sensorimotrices, associatives ou limbiques) (Alexander 1986; Haber 2003). Ce principe d'organisation des voies corticostriatales est essentiel pour élucider la physiopathologie de divers troubles neurologiques. Des altérations de cette connectivité cérébrale sont souvent associées à des conséquences cognitives et comportementales désastreuses dans un large éventail de conditions psychiatriques et neurologiques comme la schizophrénie (Bullmore, Frangou, et Murray 1997), le trouble bipolaire, l'épilepsie (Royer et al. 2022), le trouble de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH), le troubles du spectre autistique TSA (Crossley et al. 2014; Zeng et al. 2017), La maladie de Parkinson ainsi que la maladie de Huntington. Dans cette partie, nous décrirons plus particulièrement le cas de la maladie de Huntington pour sa spécificité à altérer le réseau cortico-striatal, la maladie de Parkinson pour sa spécificité à déréguler les projections dopaminergiques sur le striatum et altérer le fonctionnement des boucles cortico-ganglion de la base-thalamo-corticales, ainsi que les Troubles autistiques pour son caractère neurodéveloppemental dans la mise en place de divers circuits, dont le réseau cortico-striatal.

##### Maladie de Huntington

La maladie de Huntington est un trouble neurologique héréditaire dévastateur avec des manifestations tardives (autour de 40 ans) (Ross et Tabrizi 2011). Cette maladie neurodégénérative est principalement caractérisée au niveau moteur par des mouvements involontaires, mais également par des symptômes psychiatriques et cognitifs qui varient d'un individu à l'autre. Au stade avancé de la maladie, des troubles moteurs tels que la bradykinésie et la rigidité sont observés, à mesure que la pathologie progresse, les fonctions autonomes, y compris la régulation du rythme cardiaque et de la respiration, deviennent gravement altérées. Ces complications finissent par entraîner une défaillance des systèmes cardiorespiratoires, conduisant inévitablement à la mort par arrêt cardiorespiratoire. La neuropathologie de la maladie inclut la dysfonction sélective et la neurodégénérescence des

neurones épineux moyens du striatum (les SPN décrits précédemment) ainsi que de certains neurones corticaux spécifiques au sein du cortex cérébral (Ross et Tabrizi 2011). La mutation responsable de cette pathologie provoque une expansion de la répétition polyglutamine (polyQ) dans le domaine N-terminal de la protéine, désignée sous le terme mHTT (mutated-HTT). Cette expansion anormale de polyQ est à l'origine des dysfonctionnements cellulaires et des symptômes caractéristiques de la maladie. La protéine Huntingtine est responsable de plusieurs fonctions neuronales et physiologiques importantes comme le trafic, l'endocytose et le recyclage de vésicules neuronales, la migration, la division et la différenciation cellulaire, et le développement embryonnaire (Saudou et Humbert 2016). Dans la maladie de Huntington, la toxicité associée à la mutation de la huntingtine, combinée à une perte de fonction physiologique de la protéine, conduit à un dysfonctionnement neuronal suivi de la mort des neurones*. Tabrizi et al.* ont imagé sur une période de 12 mois, par imagerie à résonance magnétique, l'évolution du volume de matière grise de patients atteints de la pathologie. Ils ont pu identifier les régions touchées par la maladie et ont montré une diminution significative du volume de matière grise spécifiquement dans plusieurs régions dont le striatum avec une forte perte de volume du putamen et du noyau caudé (Figure n°9 A,B).

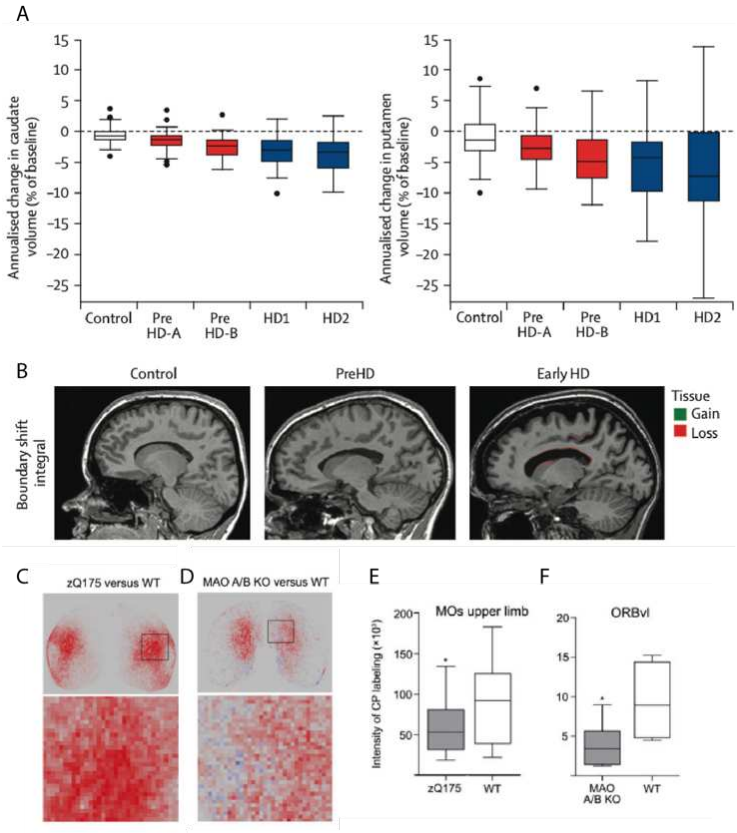



*Figure 9 Altérations du circuit cortico-striatal dans la maladie de Huntington. (A) Relevé de la variation volumique du noyau caudé et du putamen sur une année, avec en blanc le groupe contrôle, en rouge des patients « preHD » porteurs de la mutation HTT mais n'ayant pas encore de symptômes, et en bleu des patients HD présentant des symptômes. (B) Image IRM 3T montrant la variation volumique du cerveau sur une année, avec en rouge la perte de volume et en vert le gain. (C) Souris sQ175 exprimant la maladie de Huntington et comparaison des projections corticales dans le striatum par rapport à un contrôle ; la couleur rouge représente une diminution des projections corticales par rapport aux souris contrôles. (D) Même image mais avec des souris MAO A/B KO présentant le TSA. (E) Intensité des projections corticales provenant des aires motrices secondaires des membres supérieurs (MOs) chez les souris HD. (F) Intensité des projections corticales provenant du cortex orbito-frontal ventrolatéral (ORBvl) sur le striatum des souris TSA, comparée à celle des souris contrôles. Adaptée de Tabrizi et al. et Hintiryan et al (Ross et Tabrizi 2011; Hintiryan et al. 2016).*

De plus, en utilisant des souris hétérozygotes zQ175, un modèle de souris transgénique où la partie du gène HTT de la souris a été remplacée par une séquence humaine du gène HTT contentant une expansion de 175 répétitions CAG, qui codent une répétition anormale de la polyglutamine, caractéristique de la maladie d'Huntington (z provient du nom créateur de la lignée, Zeitlin). *Hintiryan et al.* (Hintiryan et al. 2016) ont pu montrer une forte diminution des projections corticales vers différentes parties du striatum (de l'ordre de 40-60%) dans les souris exprimant la pathologie. De façon intéressante, les projections des aires moteurs secondaires des membres supérieurs semblaient les plus affectées. Ainsi nous avons pu voir que la maladie de Huntington engendre une dégénérescence du striatum, du cortex cérébral et des projections cortico-striatales provoquant une perturbation de l'équilibre du réseau et

conduisant à des mouvements moteurs involontaires, des troubles cognitifs et psychiatriques caractéristiques de la maladie.

### Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative progressive. Les patients atteints de la maladie souffrent de symptômes moteurs et des troubles cognitifs et psychiatriques, tels que la dépression, l'anxiété et l'apathie (Armstrong et Okun 2020). Les symptômes moteurs principaux de la maladie de Parkinson, incluant l'akinésie, la bradykinésie, le tremblement au repos et la rigidité, sont causés par la dégénérescence des neurones dopaminergiques, par agrégation d'alpha-synucléine (α-syn) (corps de Lewis), dans la substance noire. De plus, la diminution des niveaux de dopamine (DA) dans les ganglions de la base induit de nombreuses adaptations au niveau cellulaire et synaptique dans ce circuit. Cette adaptation pathologique est étroitement liée aux symptômes moteurs dévastateurs de la maladie de Parkinson en altérant les boucles cortico-GB-thalamo-corticales.

Comme nous l'avons précisé **chapitre 1.2.1**, les SPN du striatum reçoivent des afférences glutamatergiques du cortex et dopaminergiques de la substance noire. Il a été montré que dans le striatum la majorité des synapses glutamatergiques corticales sont régulées par l'innervation dopaminergique (Arbuthnott 2014). Ainsi la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson engendre une altération de la balance excitatrice/inhibitrice entre les voies directes et indirectes du striatum produisant les symptômes moteurs de la pathologie (Martel et Galvan 2022). Une série d'évènements adaptifs se mettent alors en place dans les ganglions de la base avec une majorité des modifications dans les projections corticales sur le striatum. Une partie des synapses glutamatergiques provenant des aires corticales sont perdues par une désafférentation des neurones corticaux (Arbuthnott 2014), et l'activité des neurones projetant sur le striatum est altérée, provoquant une synchronisation excessive de l'activité suffisante pour provoquer l'akinésie (Beck et al. 2016). D'autres hypothèses proposent que la modification du fonctionnement du réseau cortico-striatal dans la maladie de Parkinson ne soit pas seulement impliquée dans la physiopathologie de la maladie, mais pourrait être un contributeur majeur de la dégénération des neurones dopaminergiques en favorisant la sécrétion extracellulaire d'α-syn favorisant son agrégation dans les neurones dopaminergiques (Emmanouilidou et al.

2016). De nouveaux modèles sont nécessaires pour avancer dans la compréhension des mécanismes cellulaires complexes de cette maladie et du rôle, ainsi que de la plasticité, du réseau cortico-striatal. Le remodelage des circuits à grande échelle est particulièrement complexe à étudier, car il implique des interactions dynamiques entre de multiples régions cérébrales. Il est donc indispensable de développer des outils performants qui permettent d'observer et de mesurer ces changements de manière précise et en temps réel. En outre, il est crucial de pouvoir distinguer les événements primaires, liés directement aux dysfonctionnements neuronaux, des réarrangements secondaires homéostatiques qui, bien qu'ils visent initialement à compenser les altérations, finissent par déséquilibrer encore davantage le réseau cérébral. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettra d'éclairer comment ces processus de compensation échouent et contribuent à l'aggravation des symptômes de la maladie.

### Troubles du spectre de l'autisme

Les troubles du spectre autistique (TSA) est un terme utilisé pour définir un groupe de troubles cliniquement hétérogènes, et malgré leur compréhension encore limitée, sont un exemple significatif de remodelage pathologique du réseau cortico-striatal. Des études ont montré que des altérations fonctionnelles et anatomiques du cortex et du striatum (Di Martino et al. 2011; Casanova et al. 2006) sont présentes chez des patients souffrant de troubles du spectre autistique. Ils reposent sur deux symptômes principaux qui sont une communication sociale altérée et des comportements répétitifs (Bhat et al., 2014; Fakhoury, 2015). Un grand nombre de mutations génétiques ont été associées à la pathogenèse des troubles du spectre autistique (Nakanishi et al., 2019; Verma et al., 2019). Au cours des années, de nombreuses études sur ces anomalies génétiques ont révélé une altération de la croissance axonale, un déséquilibre de la balance excitation/inhibition des réseaux neuronaux, et une plasticité synaptique déficiente dans le réseau cortico-striatal (Fuccillo 2016). Dans leur étude, *Hintiryan et al.* ont aussi utilisé des souris MAO A/B knockout, qui présentent une dérégulation des niveaux de certains neurotransmetteurs comme la dopamine et la sérotonine observés chez des individus atteint de TSA ainsi que des comportements répétitifs et des altérations de la communication sociale typiques des symptômes des TSA chez l'homme. Dans ces souris exprimant les troubles du spectre autistique, les auteurs ont

quantifié une diminution de 60-90% des projections corticales issues du cortex orbito-frontal ventrolateral vers différentes parties du striatum mettant en valeur la disruption du réseau cortico-striatal dans cette pathologie. De plus, chez l'humain, la mutation du gène SHANK3, codant la protéine SHANK qui a un rôle crucial dans la formation et le maintien des synapses (Sheng et Kim 2000) est impliqué dans les TSA car sa haploinsuffisance est responsable de presque 1% de tous les cas de TSA (Uchino et Waga 2013). Par ailleurs, la transmission synaptique du réseau cortico-striatal est altérée dans des souris présentant la mutation SHANK3 avec une diminution des récepteurs glutamatergiques dans le striatum et une densité synaptique réduite (Peca et al 2011). L'étiologie génétique responsables des TSA étant large nous pourrions évoquer d'autres mutations génétiques et leurs implications dans la plasticité synaptique du réseau cortico-striatal comme la NRXN, ou du FMR1 X (le syndrome fragile). Dans un souci de concision et de clarté, je ne rentrerai pas dans ces détails, l'essentiel ici étant de comprendre que l'altération du réseau cortico-striatal est centrale dans la genèse des troubles neurodéveloppementaux dans les TSA (Li et Pozzo-Miller 2020).

### 1.3 Conclusion

L'étude de la formation, de l'évolution, et des perturbations des réseaux neuronaux a permis de développer une nouvelle perspective dans la compréhension du développement cérébral, de ses modifications au cours des apprentissages et des expériences, ainsi que dans les altérations observées lors des neuropathologies. Dans de nombreuses fonctions cognitives et pathologiques, les réseaux corticostriataux projetant massivement et de manière topographique depuis les aires corticales vers le striatum, porte d'entrée des ganglions de la base, sont cruciaux dans de nombreuses fonctions cognitives et dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives et psychiatriques. Les mécanismes de formation et remodelage des réseaux, tant lors du neurodéveloppement qu'à l'âge adulte, sont influencés par différents types de plasticité, évoluant de l'échelle synaptique à celle de la modification macroscopique. À l'échelle du remodelage et des perturbations des réseaux, les études réalisées chez l'humain offrent des images « a posteriori » de changements découlant de mécanismes cellulaires complexes ne permettant pas d'avoir des études précises des dynamiques cellulaires sous-jacentes. De plus, et dans la même lignée, les limitations intrinsèques des modèles *in vivo*

actuels empêchent une étude précise de l'évolution et des mécanismes sous-jacents de la mise en place ou de la réorganisation axonale.

Ainsi, il est crucial de développer des modèles biologiques capables de compléter les études d'imagerie clinique et les modèles *in vivo*. Ces outils devraient former des plateformes spécialisées dans la reproduction physiologique des réseaux neuronaux et dans l'étude approfondie des mécanismes cellulaires qui les régulent, afin d'apporter une nouvelle vision de ces évènements. Depuis 30 ans, de nouveaux modèles *in vitro* émergent, appelés Organes-sur-puces proposant la reconstruction microenvironnementale d'organes sur des systèmes microfluidiques.

# 2 Les Organes-sur-puces

L'investigation de la complexité des réseaux neuronaux nécessite des modèles biologiques robustes permettant d'explorer les mécanismes cellulaires sous-jacents à leur mise en place et à leurs modifications. Dans ce chapitre, nous détaillerons l'émergence de nouveaux modèles *in vitro* qui proposent une modélisation des organes, dont le cerveau, permettant de réaliser des études proches de la physiologie et permettre d'améliorer notre compréhension des mécanismes biologiques, des pathologies et des traitements. Nous aborderons ici l'évolution de cette technologie et ses principales caractéristiques en comparaison avec les modèles *in vitro* et *in vivo* déjà existants avant de nous plonger au chapitre suivant dans l'utilisation de cette technologie pour créer des « Cerveaux-sur-puces ».

Un organe est une entité organique typiquement composée de différents types de tissus (vaisseaux sanguins, systèmes immunitaire, nerveux, lymphatique) organisés distinctement. Ces tissus, à leur tour, sont constitués de groupes de cellules assemblées par une matrice extracellulaire, des échafaudages organiques ou des jonctions intercellulaires. De plus, ces ensembles subissent des dynamiques spécifiques à chaque organe, telles que des gradients chimiques ou des forces mécaniques (compression, tension, forces cycliques ou de cisaillement fluidique), qui sont cruciales pour leur survie, développement et fonction. De nombreux modèles *in vitro*, qu'ils soient 2D ou 3D, sont devenus des outils précieux pour l'étude cellulaire et tissulaire ainsi que pour le criblage médicamenteux. Néanmoins, ils échouent souvent à reproduire fidèlement l'architecture physiologique des tissus et leurs fonctions associées.

## 2.1 Les modèles *in vitro* et *in vivo* traditionnels

### 2.1.1 Systèmes *in vitro*

#### *2.1.1.1 Cultures cellulaires 2D & 3D.*

Il y a presque un siècle, les cultures cellulaires *in vitro* à deux dimensions (2D) ont vu le jour (Middleton et Sharp 1984). Dans ces modèles, les cellules se développent et prolifèrent

sur une surface plane, souvent en plastique ou en verre revêtue d'une matrice extracellulaire artificielle. Dans ces dispositifs, les neurones sont cultivés sur la surface plane permettant une visualisation facile, un accès direct aux cellules et à leur milieu, une facilité pour imager les cellules et une simplicité pour réaliser des enregistrements électrophysiologiques. Ce modèle de choix est privilégié pour étudier la signalisation synaptique et la plasticité neuronale. Néanmoins, il échoue dans la représentation de la complexité du microenvironnement *in vivo*, avec des différences considérables dans la morphologie cellulaire induites par la planéité de la culture, les connexions aberrantes et non contrôlées des neurones entre eux, ainsi qu'une absence d'organisation topographique des réseaux neuronaux (Soriano 2023)(voir figure 10).

Ces limitations ont mené à un fort intérêt dans la recherche de modèles *in vitro* plus avancés. Depuis cinquante ans (S. Y. Park, Hong, et Lee 2023), le développement des modèles *in vitro* à trois dimensions (3D) a apporté des avancées significatives par rapport aux cultures 2D pour la modélisation des pathologies, l'investigation du développement et des fonctions biologiques, ainsi que le criblage de médicaments (Figure N°10). Généralement basés sur des hydrogels, composés soit de molécules naturelles de la matrice extracellulaire soit de polymères synthétiques, les modèles *in vitro* 3D peuvent prendre différentes formes. Les cellules peuvent être dispersées au hasard dans l'hydrogel ou regroupées en microstructures cellulaires auto-assemblées appelées organoïdes reproduisant plus fidèlement la complexité tridimensionnelle du cerveau. Ces modèles se sont montrés plus efficaces pour l'étude des mécanismes moléculaires de la fonction des tissus, des voies de signalisation et de la réponse aux médicaments dans certaines conditions pathologiques. Notamment, les organoïdes cérébraux dérivés de cellule de patient humain (iPSCs) ont été utilisés pour modéliser plusieurs maladies neurodéveloppementales comme la microcéphalie (Mariani et al. 2012), l'autisme (Nieto-Estévez et Hsieh 2020) ou l'épilepsie (S. Kim et Chang 2023) afin d'apporter des réponses sur le développement et la mise en place des architectures structurelles et fonctionnelles des réseaux.

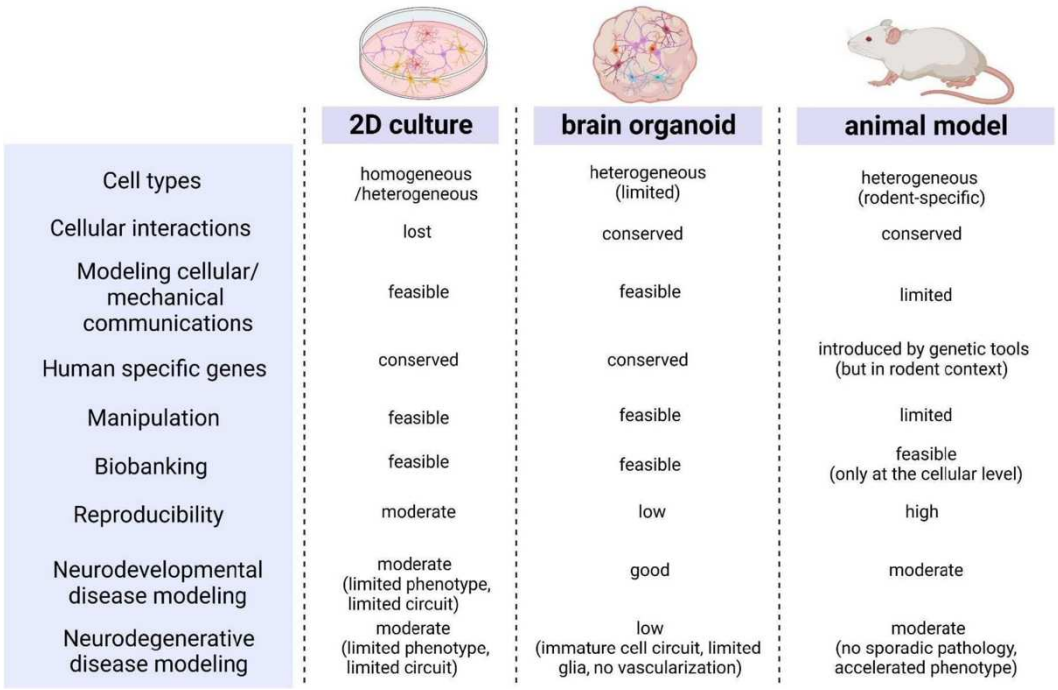



*Figure 10 Comparaison des caractéristiques entre les cultures in vitro 2D, les modèles 3D d'organoïdes cérébraux et les modèles animaux. On constate que, bien que les modèles organoïdes semblent meilleurs que les cultures 2D et les modèles animaux pour la conservation de la spécificité des gènes humains, les types cellulaires restent limités et la reproductibilité faible. Tiré de Kim et al., 2023.*

Toutefois, les organoïdes cérébraux ne peuvent pas contenir toutes les cellules composant le cerveau humain ce qui limite leur habilité à reproduire correctement les fonctions cérébrales et les pathologies. La physiologie miniature de ces organoïdes ne mime pas avec précision la physiologie du cerveau humain, et ne représentent pas l'organisation spatiale des différents types cellulaires et des régions cérébrales du cerveau humain (Andrews et Kriegstein 2022). L'absence de vascularisation limite aussi leur taille empêchant la circulation de nutriments et d'oxygène à l'intérieur de l'organoïde, au-delà de 400µm, conduisant au stress cellulaire, à l'hypoxie et à la nécrose (Lee et al. 2017). La variabilité en taille et en forme, et la difficulté à maintenir les cellules dans des positions constantes pour réaliser des analyses approfondies et longitudinales, limitent la reproductibilité des résultats par impossibilité de standardisation (Zhao et al. 2022). De plus, bien que prometteurs pour l'étude du développement et des maladies du cerveau humain, ils présentent une grande hétérogénéité et un manque de reproductibilité, qui constituent des défis majeurs. En effet, leur taille peut varier considérablement, allant de quelques millimètres à plus d'un centimètre, et leur complexité structurelle dépend de nombreux facteurs, tels que les protocoles utilisés pour les cultiver. Cette variabilité, tant en termes de taille, d'âge, que de composition

cellulaire, complique la standardisation des expériences et réduit la fiabilité des résultats obtenus (X. Qian, Song, et Ming 2019).

L'analyse fonctionnelle des cellules en 3D présente également des défis importants. L'accès à leur contenu luminal pour la quantification des processus de transport cellulaire et extracellulaire, ainsi que l'absorption ou la sécrétion de molécules, est limité par les difficultés d'accès optique et par la complexité des prélèvements. Ces obstacles rendent l'échantillonnage difficile pour les analyses biochimiques ou génétiques. De plus, les cellules ne sont pas exposées aux stimuli mécaniques naturels, tels que le stress de cisaillement fluidique ou la tension et compression des tissus, qui jouent un rôle crucial dans le développement et la fonction de nombreux organes, aussi bien en conditions saines que pathologiques. La maturation incomplète des neurones dans les organoïdes cérébraux se manifeste par des morphologies dendritiques et axonales incomplètes produisant des motifs de projection désorganisés et peu physiologiques qui réduisent leur capacité à recapituler des réseaux neuronaux (Urrestizala-Arenaza et al. 2024). Cette immaturité limite aussi la modélisation des maladies neurodéveloppementales qui prennent place dans des réseaux adultes vieillissants.

Ainsi, les organoïdes cérébraux et les cultures en 3D représentent un pas en avant significatif pour la modélisation du développement cérébral humain et offrent des opportunités intéressantes pour la recherche biologique. Cependant, ces systèmes présentent encore des limitations pour être utilisés de manière standardisée. Le manque de vascularisation, la maturité incomplète des cellules, ainsi que l'hétérogénéité et la faible reproductibilité entre les expériences rendent difficile leur application pour des pathologies complexes liées à l'âge ou à la dégénérescence des réseaux.

#### *2.1.1.2 Les modèles in vivo*

Comme nous l'avons vu, les modèles *in vitro* 2D et 3D présentés ne permettent pas une modélisation complexe se rapprochant de la physiologie de l'organe. L'analyse de la physiologie et des processus pathologiques demande l'utilisation de modèles animaux qui permettent d'étudier les processus complets du cerveau de manière holistique. Les avancées des techniques en génie génétique, telle que l'édition de gènes et la transgenèse, comme par

exemple par CRISPR-CAS9 (Doudna et Charpentier 2014) ont permis la création de modèles animaux capables de mieux reproduire des conditions pathologiques humaines spécifiques, telles que les maladies neurodégénératives, avec les souris transgéniques pour l'APOE4 (Holtzman, Herz, et Bu 2012) modélisant la maladie d'Alzheimer, des modèles murins SOD1 G93A modélisant la sclérose latérale amyotrophique (Gaj et al. 2017), ou neurodéveloppementales, avec de nombreux modèles d'épilepsie (Wang et al. 2022) ou des troubles autistiques (Delling et Boeckers 2021).

Les modèles *in vivo* présentent l'avantage unique de développer des phénotypes progressifs qui sont comparables avec ceux observés chez les humains. En reproduisant les environnements biologiques complexes, tels que les interactions cellulaires au sein des organes, ces modèles permettent d'étudier le développement des pathologies dans un cadre physiologique. Contrairement aux approches *in vitro*, les modèles *in vivo* permettent d'étudier les pathologies à travers différentes phases du développement embryonnaire jusqu'à la vieillesse. Ils sont particulièrement précieux pour l'observation des comportements complexes et l'analyse de la plasticité neuronale, essentielle à l'étude de l'apprentissage et du remodelage comportemental. Les expérimentations animales permettent également des observations phénotypiques impossibles *in vitro*, comme l'évolution de réponses physiologiques ou comportementales face à des stimuli externes, offrant ainsi une meilleure compréhension des maladies et facilitant l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques.
Cependant, les différences inter-espèces peuvent conduire à une grande variation dans les réponses physiologiques et pharmacologiques entre animaux et humains, rendant difficile la transposition et la prédiction des résultats chez ce dernier (Lancaster et al. 2013). De plus, le système immunitaire humain et rongeur présente des différences significatives, limitant la pertinence des modèles animaux dans l'évaluation des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque (Mestas et Hughes 2004). Enfin les coûts extrêmement élevés associés à l'entretien des modèles *in vivo* ainsi que les considérations éthiques liées à leur utilisation posent des défis importants et contraignent fortement l'utilisation de ces modèles. Déjà depuis 2011, *Knight et al*. remettent en question le recours systématique aux modèles animaux en raison des souffrances générées (Knight 2011). De plus en plus d'agences de régulation, comme, par exemple, l'Union européenne avec la directive 2010/63/EU, et les Etats-Unis avec l'Agence de protection environnementale, sont très actives dans la réduction

de l'utilisation des modèles animaux. Elles appellent à appliquer le principe des 3R (réduction, raffinement et remplacement) et poussent à l'exploration des modèles *in vitro* alternatifs, comme les organes-sur-puces, et la volonté de limiter l'utilisation des modèles *in vivo* au strict minimum.

#### *2.1.1.3 Conséquences dans la compréhension des mécanismes et dans le développement de médicaments*

Comme nous l'avons vu tout au long de ce chapitre, les modèles *in vitro*, malgré leur utilité, présentent plusieurs limites dans l'étude des mécanismes biologiques complexes. Les cultures cellulaires en monocouches ne parviennent pas à reproduire l'architecture tridimensionnelle, l'organisation tissulaire ni l'environnement dynamique des tissus. Elles manquent également de diversité cellulaire et des d'interactions complexes nécessaires pour simuler de manière adéquate les processus biologiques tels, les réponses aux stimuli mécaniques et biochimiques, ainsi que l'homéostasie tissulaire. Bien que les organoïdes, des structures multicellulaires en 3D dérivées de cellules souches, aient permis de contourner certaines de ces limitations, ils restent encore simplifiés par rapport aux tissus natifs. Ils manquent de vascularisation et des interactions systémiques globales présentes dans un organisme entier en restant des modèles complexes et hétérogènes diminuant la robustesse des résultats. Les modèles *in vivo*, bien qu'offrant un contexte plus global, souffrent eux de la diversité inter espèces et d'une hétérogénéité physiologique, rendant l'extrapolation des résultats aux mécanismes humains difficile. Face à ces conséquences, il y a un besoin de développer des nouveaux modèles *in vitro* capables de rassembler les avantages et limiter les inconvénients des modèles déjà utilisés.

Du côté du développement médicamenteux, nous pouvons définir l'attrition, comme le taux d'échec de candidats médicamenteux au cours d'un processus de développement, qui est d'environ 90-95% (Seyhan 2019). La majorité des candidats échouent en phase clinique II-III, particulièrement en raison d'un manque d'efficacité ou de problèmes de sécurité non prédits par les modèles précliniques *in vitro* et *in vivo* existants. Notamment, les modèles in vitro manquent la reproduction précise du microenvironnement pour produire des réponses adéquates prédictives de la toxicité et de l'absorption, distribution, métabolisme et excrétion (ADME) des médicaments (Ewart et Roth 2021). Les modèles *in vivo* eux, sont limités par les

différences inter-espèces générant des différences dans les réponses immunitaires et métaboliques des animaux, rendant difficile la transposition des résultats chez l'homme (Sillé et Hartung 2024). Enfin, d'un point de vue économique le nombre de nouveaux médicaments approuvés par milliard de dollars dépensé est divisé par deux tous les neufs ans depuis 1950 (Scannell et al. 2012; Kola et Landis 2004). L'industrie pharmaceutique recherche donc activement des modèles précliniques pertinents et efficaces pour mieux prédire les effets (souhaités ou secondaires) lors des phases précliniques, tout en éliminant rapidement les molécules non prometteuses. Cela permet de réduire les risques dans les études cliniques tout en maitrisant les coûts de R&D (Ewart et Roth 2021).

Au cours des trente dernières années, des avancées majeures en micro-ingénierie, microfluidique et biologie cellulaire ont convergé pour aboutir au développement des "organes-sur-puces". Ces dispositifs permettent de recréer de manière organisée l'architecture structurale des organes ainsi que leur complexité fonctionnelle. En utilisant des cultures cellulaires en 2D ou 3D dans des puces microfluidiques, ils offrent une microarchitecture pertinente et un contrôle précis du microenvironnement, adapté à chaque type cellulaire, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour la recherche biomédicale et le développement de médicaments.

### 2.2 Convergence de la micro-fabrication, de la microfluidique et de la biologie cellulaire

La microfluidique est le nom de la technologie qui permet de manipuler précisément des fluides à l'échelle micro volumétrique (typiquement entre $10^{-9}$ et $10^{-18}$ Litre) (Whitesides 2006). Ceci est possible par des techniques de micro-fabrication qui, d'abord développées pour la manufacture de processeurs informatiques, ont été adaptées pour la fabrication de micro canaux ( de $10^{-6}$ a $10^{-4}$ mètres). Ces microcanaux apportent des avantages significatifs pour le contrôle fluidique en raison de leur capacité à manipuler les fluides à l'échelle microscopique. De plus, associés à des systèmes de pompage adaptés, les microcanaux permettent la manipulation des fluides avec une grande précision et efficacité. Cette structure de base peut être déclinée en taille et en forme pour devenir des dispositifs microfluidiques (Farhang Doost et Srivastava 2024). Ces dispositifs permettent une consommation faible de volume réactifs, un contrôle du fluide (caractérisé par un flux laminaire et un transfert de masse élevé) qui est exploité pour créer des systèmes, compacts, intégrés, avec un rapport

coût-efficacité faible inenvisageable avec les traditionnels systèmes et techniques macroscopiques.

De plus, avec des dimensions comparables aux architectures biologiques, les dispositifs microfluidiques permettent de reproduire de manière contrôlée des microenvironnements biologiques pour la culture et l'étude des interactions intercellulaires et celles avec la matrice extracellulaire. Ces dispositifs offrent les avantages inhérents aux cultures *in vitro*, tels que l'accès en temps réel aux observations, ainsi qu'une grande robustesse et reproductibilité des résultats. Les cellules peuvent ainsi être cultivées sur ces dispositifs, les micro-canaux permettant la diffusion des substrats, des nutriments et des réactifs par perfusion continue ou non. Il est aussi possible, toujours par perfusion, de générer du stress de cisaillement fluidique nécessaire pour la pertinence biologique de certaines cultures cellulaires. D'autres forces peuvent être appliquées comme la diélectrophèse ou des forces magnétiques qui permettent la concentration, la séparation et le tri cellulaire (Tehranirokh et al. 2013; Wong et al. 2004; Abd Rahman, Ibrahim, et Yafouz 2017). En utilisant des gradients chimiques spatio-temporels pertinents et des signaux mécaniques dynamiques adaptés à chaque organe, Il est ainsi possible d'exprimer des phénotypes proches de la physiologie.

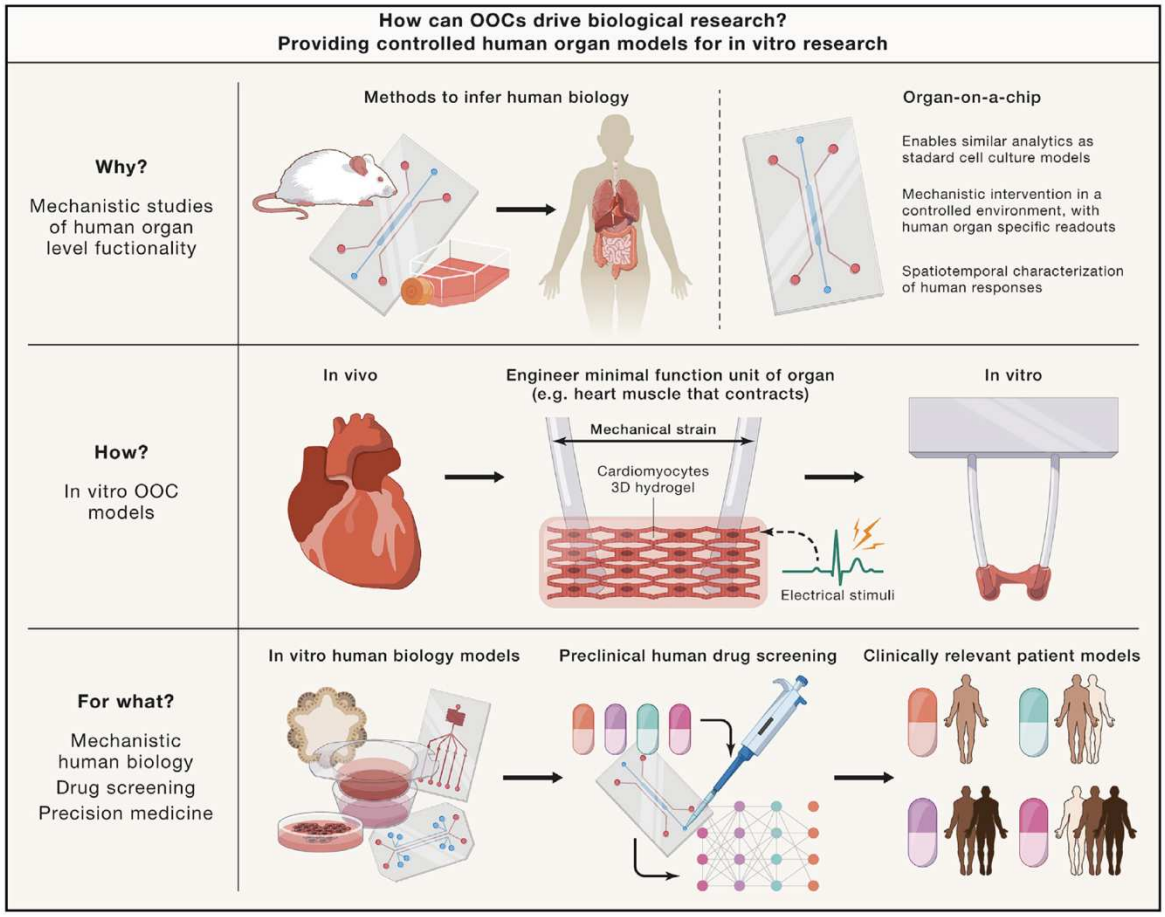



*Figure 11 Rôle des organes-sur-puces dans la recherche biologique. Les organes-sur-puces sont des systèmes in vitro spécialisés dans la reproduction d'un ou de plusieurs organes pour des applications de modélisation de pathologies, d'études précliniques et de médecine personnalisée. Tiré de Radisic, 2021.*

Appelés « Organes-sur-puces » depuis 2010 (Figure n°11) (D. Huh et al. 2010), ces dispositifs microfluidiques sont des systèmes microphysiologiques (MPS) (Bhatia et Ingber 2014) de culture *in vitro* qui permettent la reconstruction structurelle de l'arrangement tissulaire des organes et la reproduction de leurs fonctions biologiques basiques permettant des avancées significatives dans la recherche biologique. Le principe général de la conception des organes-sur-puces repose sur une analyse réductionniste de l'organe cible. Il est donc nécessaire de comprendre la structure des organes d'intérêts et de simplifier leurs fonctions physiologiques pour reproduire spécifiquement celles désirées. De nombreux organes-sur-puces ont été développé pour modéliser les fonctions clés et la structure d'organes humains majeurs, tels que les poumons, le cœur, les intestins, le foie, l'utérus, le cerveau, en conditions saines et pathologiques. Nous les présentons succinctement dans le tableau n°01 et nous détaillerons plus précisément les systèmes utilisés en neurosciences (Cerveaux-sur-puces, nerf-sur-puces et barrière hémato-encéphalique sur puces) dans le chapitre suivant.

Tableau n°01

| ***Organe-sur-puce*** | ***Pathologies*** | ***Références*** |
|---|---|---|
| Poumon | Cancer du poumon, asthme, SARS-CoV-2 | (D. (Dan) Huh 2015) |
| Foie | Hépatites, Fibrose | (Beckwitt et al. 2018) |
| Coeur | Infarctus du myocarde, arythmie | (Criscione et al. 2023) |
| Intestin | Cancer colorectal, Inflammation de l'intestin | (H. J. Kim et al. 2012) |
| Peau | Tests de cosmétiques et de produits pharmaceutiques pour l'irritation ou la toxicité cutanée. Études de cicatrisation | (Sutterby et al. 2020) |
| Utérus | Modélisation de complications liées à la grossesse. Études de l'endométriose | (Ahn et al. 2021) |
| Reins | Études de toxicité rénale des médicaments. étude sur l'insuffisance rénale aiguë et chronique | (Schutgens et al. 2019) |

Les organes sur puce se situent à l'interface des modèles *in vitro* classiques et des modèles *in vivo*, offrant une approche pour reproduire des fonctions organiques dans des microenvironnements contrôlés. Ils intègrent, comme nous l'avons vu, des flux microfluidiques pour simuler des conditions mécaniques et chimiques réalistes, telles que le flux sanguin et les gradients de nutriments. Les organes-sur-puces se distinguent également par leur capacité à modéliser des interactions dynamiques entre cellules de différents types, imitant ainsi plus fidèlement les conditions physiologiques humaines. Cela permet d'étudier des phénomènes cellulaires avec une précision accrue, tout en offrant un meilleur contrôle par rapport aux modèles *in vivo*, souvent coûteux et éthiquement contraignants (Driver et Mishra 2023).

Cependant, malgré leurs nombreux avantages, les OOC présentent certaines limites. Leur approche reste une modélisation simplifiée de la complexité des organismes entiers, rendant difficile la modélisation des interactions multi-organes et de la physiologie intégrée. De plus, les systèmes OOC restent principalement adaptés aux études de biologie cellulaire et

moléculaire, mais ne permettent pas d'explorer des fonctions physiologiques plus globales, comme la cognition ou les interactions systémiques (Ito et al. 2024).

Pour modéliser de façon simpliste un organe, il est crucial de spécifier sa structure et les fonctions tout en veillant à garder sa pertinence physiologique. Pour ceci quatre aspects sont essentiels à considérer :

- La conceptualisation de la microstructure et le design de la culture.
- La sélection des cellules.
- Les forces mécaniques et les gradients chimiques auxquels l'organe est soumis.
- Les analyses souhaitées.

Dans ce chapitre nous explorons chacun des aspects afin d'offrir une compréhension globale des capacités des organes-sur-puces.

## 2.3 Conceptualisation et Design

### 2.3.1 Géométrie de la culture

Les cellules à l'intérieur des dispositifs microfluidiques peuvent être cultivées en 2D ou en 3D. Les cultures 2D sont largement utilisées pour les organes-sur-puces en raison de leur simplicité de mise en place et de manipulation. De plus elles permettent une observation directe des cellules contrairement aux cultures 3D qui sont plus complexes et peuvent représenter un défi technique pour leur mise en place, leur maintien et leur observation. Les cultures 3D offrent néanmoins une meilleure organisation tridimensionnelle des environnements tissulaires que les cultures 2D, modélisant de manière plus réaliste les processus biologiques de signalisation, différenciation et morphogenèse. Ainsi le choix de développer un organes-sur-puces avec des cultures 2D ou 3D dépend surtout des besoins spécifiques de l'étude. Dans les deux cas de cultures, les organes-sur-puces présentent l'avantage de précisément contrôler l'organisation et la compartimentalisation cellulaire. Ils peuvent être distingué en organe-sur-puce seul (unimodal) ou en multi organes-sur-puces (multimodal) lorsque qu'ils sont associés à d'autres systèmes.

#### *2.3.1.1 Organe-sur-puce unimodal*

La conception d'organe-sur-puce unimodal signifie que la puce simule un organe ou une fonction d'un organe spécifique et n'est pas connecté avec d'autres systèmes biologiques.

Ainsi, un organe-sur-puce seul possède une ou plusieurs entrées pour la perfusion ou l'injection de milieu de culture et de molécules, ainsi qu'une ou plusieurs sorties pour récupérer le milieu. Les systèmes organes-sur-puce unimodal permettent souvent d'avoir une meilleure authenticité de l'analyse biologique de l'organe simulé, facilitant l'étude des mécanismes physiologiques et des réponses aux médicaments (Teixeira et al. 2020). Les Cerveaux-sur-puces simples reproduisent des circuits neuronaux avec au moins deux populations pour des études mécanistiques précises et un contrôle total sur les corps cellulaires, les axones et les terminaisons axonales (Figure n°12 a,c). Nous reviendrons sur ce design dans le prochain chapitre.

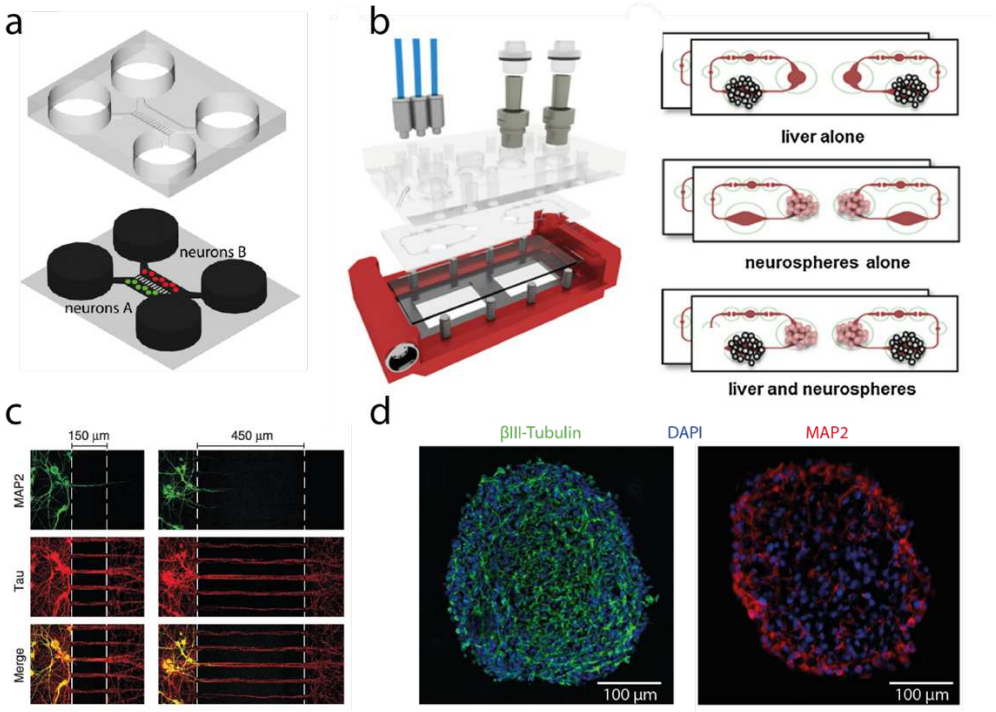



*Figure 12 Cerveaux-sur-puce unimodal et multi organes-sur-puces. (a, c) Puce pour la reconstruction d'un réseau neuronal simple en 2D dans une puce en PDMS, et immunofluorescence avec Tau (rouge) montrant la pousse axonale des neurones MAP2 (vert) à travers des microcanaux. Adapté de Taylor et al., 2005, 2010 (Taylor et al. 2005; 2010). (c, d) Multi organes sur puces cerveau-foie en 3D avec immunofluorescence des neurosphères βIII-tubulin (vert) pour les axones, MAP2 (rouge) pour l'actine, et DAPI (bleu) pour les noyaux. Adapté de (Materne et al. 2015).*

#### *2.3.1.2 Organe-sur-puce multimodale*

Les organes-sur-puces multimodaux sont des Organes-sur-puces unimodal couplés entre eux, le plus souvent en série, et fournissant un cadre plus complet pour examiner l'interaction potentielle d'un organe avec au moins un autre, principalement dans le cadre d'échange de métabolites ou de molécules de signalisation (Figure n°12 c). Ils permettent ainsi l'étude des interactions interorganiques et des effets systémiques, et sont communément désignés sous le terme « Corps-sur-Puce » (Leung et al. 2022). Ils sont très intéressants pour étudier les processus complexes d'absorption/distribution/métabolisme/excrétion/toxicité (ADMET) qui nécessitent plusieurs acteurs organiques. Les systèmes corps sur puce sont également largement utilisés pour l'étude quantitative de la pharmacocinétique ou pharmacodynamique (PK/PD) d'un composé. Cependant, de tels systèmes sont complexes à mettre en place. Physiologiquement perfusés par le sang, les organes sur puces sont alimentés *in vitro par* différents milieux de cultures qui ont été optimisés pour chaque culture cellulaire, ce qui rend difficile de trouver des milieux de cultures communs à plusieurs populations (Mastrangeli et al. 2019). De plus, la combinaison de plusieurs organes s'accompagne de challenges significatifs dans les particularités de fabrication, de perfusions et de forces. La gestion de la perfusion est particulièrement complexe, car chaque organe à des besoins en débit et composition nutritives spécifiques nécessitant le développement d'un milieu de culture *in vitro* adapté à plusieurs types cellulaires.

La géométrie d'un organe-sur-puce joue un rôle crucial dans la conception des canaux et de leurs fonctions associées. De nombreux organes-sur-puces ont été développés avec des géométries de plus en plus complexes pour mieux refléter la physiologie des tissus. Par exemple, un organe-sur-puce peut être conçu avec un simple canal peuplé de cellules spécifiques. Dans une étude, les chercheurs ont recréé la physiologie rénale en utilisant des cellules épithéliales sur une membrane semi-poreuse pour simuler un rein-sur-puce, permettant ainsi d'évaluer la morphologie de l'épithélium et l'intégrité de la membrane (Wang et al. 2022) (Figure n°13 a). D'autres études ont utilisé des puces plus complexes, comprenant plusieurs chambres, comme une puce à quatre chambres (deux latérales et deux centrales) séparées par une membrane semi-poreuse pour simuler la physiologie intestinale. Ces cellules épithéliales de l'intestin ont été soumises à des forces de compression et d'extension cycliques, et des poumons-sur-puces ont également été soumis à des effets de dilatation et de compression pour imiter la respiration (Figure n°13 b,c). Bien que le degré de complexité

d’un organe-sur-puce puisse théoriquement être augmenté indéfiniment pour se rapprocher au plus près de la physiologie de l'organe reproduit, cela entraîne des défis croissants en termes de fabrication, d’utilisation et de coûts. De plus, un tel modèle pourrait perdre en pertinence biologique s'il devient trop complexe à manipuler ou difficile à reproduire, compromettant ainsi la robustesse des résultats obtenus. Il est donc crucial de trouver un équilibre entre la fidélité au modèle physiologique et la simplicité nécessaire pour garantir la reproductibilité et l'efficacité expérimentale.

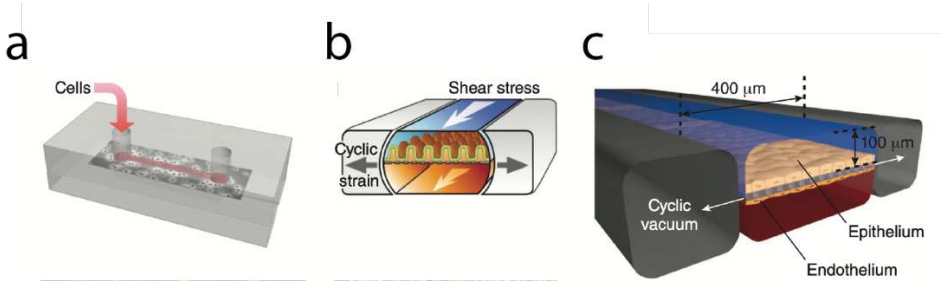



*Figure 13 Exemples d’organes sur puces avec des organisations cellulaires de plus en plus complexes. Rein-sur-puce où les cellules épithéliales sont cultivées au-dessus d’une membrane poreuse (Wang et al. 2022)(a). Intestin-sur-puce dans lequel des cellules Caco-2 intestinales épithéliales humaines sont cultivées sur une membrane poreuse en PDMS, côté avec une matrice extracellulaire séparant deux chambres. Une force cyclique de compression et d’expansion est appliquée sur les parois latérales déformables (Delling et Boeckers 2021) (b). Poumon-sur-puce avec le même design que la puce en (b). Des cellules alvéolaires épithéliales humaines sont cultivées sur la membrane en PDMS avec, de l’autre côté, des cellules capillaires endothéliales humaines. De l’air circule dans la chambre supérieure pour créer une interface air-liquide avec les cellules alvéolaires, tandis que du milieu de culture circule dans la chambre inférieure, en contact avec les cellules capillaires (Gaj et al. 2017)(c).*

En conclusion, le choix d’un système organe-sur-puce, qu’il soit unimodal ou multimodal, dépend des fonctionnalités spécifiques et du niveau de complexité nécessaire pour reproduire fidèlement les processus physiologiques visés. Toutefois, il est essentiel de limiter la complexité au strict nécessaire afin d'éviter l’introduction de facteurs superflus qui pourraient compromettre la reproductibilité, la facilité d'utilisation et l’interprétation des résultats. Une fois les caractéristiques principales définies et les stratégies de modélisation arrêtées, l’étape suivante consiste à procéder à la fabrication du dispositif, en optimisant son design pour répondre aux besoins expérimentaux sans ajouter de contraintes excessives.

### 2.3.2 Fabrication

Le mot « puce » dans organes-sur-puce provient de leur méthode de fabrication, qui est une version modifiée de la photolithographie couramment utilisée dans la fabrication de

circuits intégrés et de dispositifs microélectroniques. Cette technique permet la création de surfaces de taille similaire à celle des cellules (de l'ordre du micromètre au nanomètre), facilitant ainsi la reproduction de leur environnement naturel. Les dispositifs microfluidiques destinés à être des organes-sur-puces sont fabriqués en utilisant des polymères biocompatibles adaptés à la microscopie haute résolution.

#### *2.3.2.1 Soft lithographie*

Les polymères sont des répétitions de monomères créées par polyaddition (sans perte de matière) ou polycondensation (perte d'eau, d'alcool ou d'autres substances (Waldbaur et al. 2011). Les polymères les plus couramment utilisés dans l'industrie chimique sont le vinyle, le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP) et polychlorure de vinyle (PVC) ainsi que la résine époxy. La résine SU-8 est une résine époxy photorésistante très souvent utilisée comme matériau de base pour la réalisation des dispositifs microfluidiques. Dans le cas d'une photorésistance négative, l'exposition aux UV de la SU-8 va polymériser la résine tout en laissant la résine non exposée liquide et soluble qui sera lavée durant la phase de développement permettant la création de structures micrométriques (Figure 14 A). Un autre polymère massivement utilisé pour la réalisation des dispositifs microfluidiques est le poly-diméthylsiloxane (PDMS) qui est un élastomère transparent et biocompatible facile d'utilisation et accessible. D'autres polymères peuvent être utilisés pour la réalisation de dispositifs microfluidiques comme le poly(méthyl méthacrylate) (PMMA), le polycarbonate (PC), le cyclooléfine polymère (COP) et des copolymères (COC) qui sont tous des thermoplastiques transparents, biocompatibles et adaptés à une production industrielle.
Ainsi les dispositifs microfluidiques peuvent être fabriqués directement par micro-fabrication ou par réplication. Les méthodes de micro-fabrication traditionnelles incluent les méthodes mécaniques (micro-usinage, usinage ultrasonique) ou énergétiques (usinage par décharge électrique, micro-usinage électrochimique, ablation laser, usinage par faisceau d'électron) qui sont coûteuses à mettre en place et demandent une expertise avancée. Les méthodes de fabrication par réplication incluent la photolithographie, l'estampage ou le moulage par micro-injection et jouent un rôle particulièrement important du prototypage à la commercialisation des dispositifs microfluidiques en raison de leur simplicité à mettre en œuvre, dans le cas de

la lithographie, ou de leur faible coût une fois établies pour la production de grand volume de pièces (moulage par micro-injection, estampage).

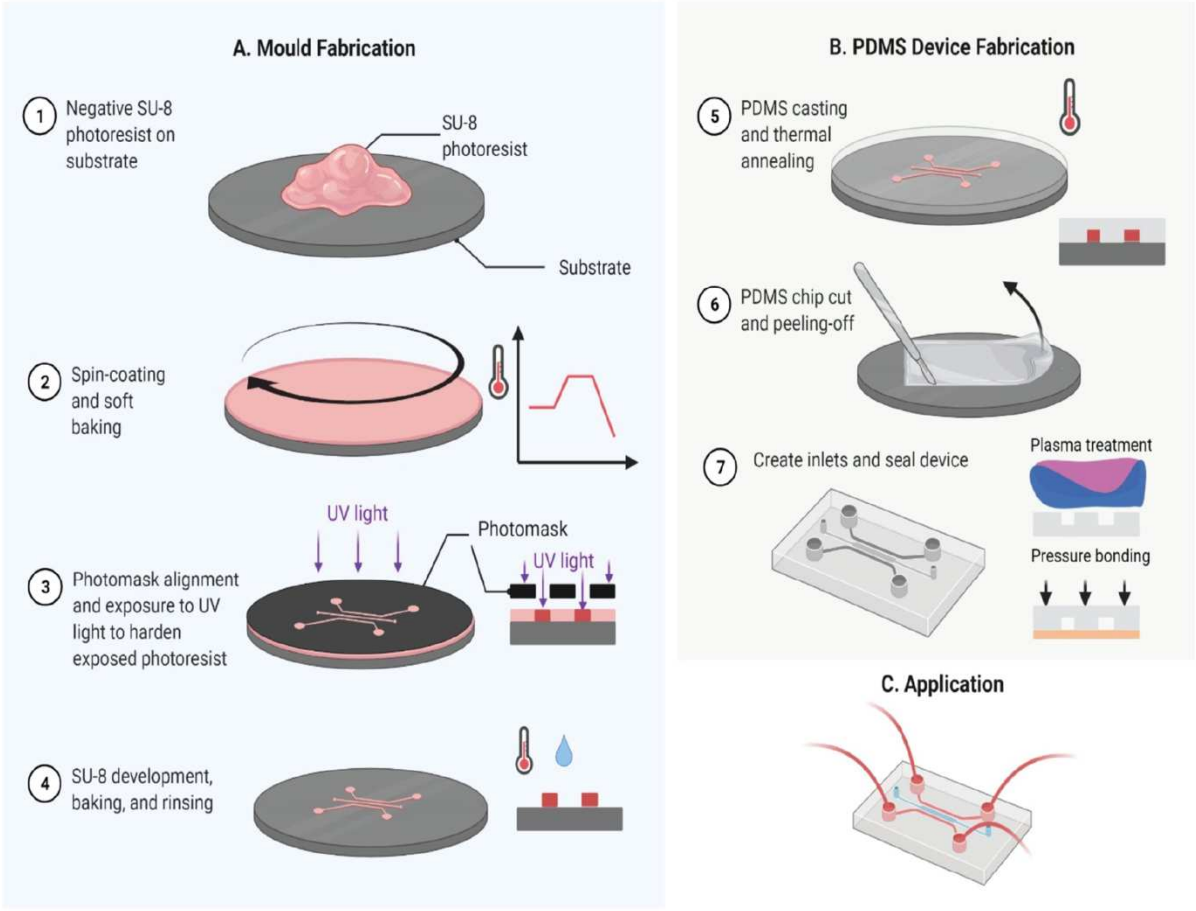



*Figure 14 Fabrication du moule avec le substrat en silicium et la résine SU-8 (A). Dépôt, polymérisation et traitement plasma pour le PDMS pour la création de la puce microfluidique (B). Tirée de (Scott et Ali 2021).*

La réalisation des dispositifs par « lithographie douce » est une méthode qui permet la réplication d'un pattern gravé dans une puce en silicium avec un pattern en SU-8 en utilisant un polymère élastomère pour produire des dispositifs microfluidiques en faible quantité. Cette méthode a proliféré pour ses avantages de coût en capital faible, ses procédures simples de production, sa haute-fidélité et la biocompatibilité des propriétés chimiques et physiques des matériaux utilisés (Xia et Whitesides 1998). Le processus de « lithographie douce » utilise un polymère liquide thermodurcissable, comme le PDMS, qui est déposé sur une microstructure en résine SU-8 patternée sur un substrat de silicium. Ce polymère est ensuite thermiquement polymérisé et retiré du moule, devenant une puce transparente avec le pattern imprimé négativement. Cette puce est ensuite collée de manière irréversible par un

plasma d'oxygène sur une surface plane, comme une lame de verre. Le côté présentant le pattern négatif est collé sur la lame de verre créant ainsi des cavités qui peuvent être linéaires, fines pour réaliser des canaux microfluidiques ou plus larges pour des chambres creuses ou des ouvertures peuvent être créées pour la perfusion fluidique (Figure 14 B).
La plupart des applications de « lithographie douce » utilisent du PDMS ou des silicones caoutchouteux. Néanmoins d'autres élastomères comme le polyuréthane (Y. Zhang et al. 2006) et le polyamides (Ding et al. 2008) ont aussi été testés. Le PDMS s'est cependant imposé comme la référence dans le domaine grâce à plusieurs de ses propriétés mécaniques, chimiques et optiques.

Par ses propriétés d'élastomère, son élasticité (définie comme sa capacité à revenir à sa forme initiale après avoir été soumis à des contraintes mécaniques fortes) peut être contrôlée en modifiant le ratio de silicone de base et de durcisseur pour gérer sa capacité à se déformer sous perfusion fluidique. Il peut aussi être déformé pour créer des structures non-planes (McDonald et al. 2000). Sa surface peut facilement être activée par un traitement au plasma d'oxygène pour former une monocouche active qui permet le collage avec une large gamme de matériaux tels que le verre, le silicium, le quartz, le PDMS, le polyéthylène ou le polystyrène (Duffy et al. 1998) pour former des cavités et des structures fermées à un ou plusieurs étages. Le PDMS est aussi chimiquement inerte, non toxique et perméable aux gaz permettant la viabilité de la culture cellulaire. Enfin sous sa forme polymérisée, il est transparent à partir d'une longueur d'onde de 280nm pour l'observation optique, le rendant compatible avec l'imagerie microscopique en biologie cellulaire.
Le PDMS présente néanmoins des désavantages pour certaines applications. Tout d'abord ses propriétés d'élastomère et d'expansion thermique lors de la polymérisation rendent difficile le contrôle précis des dimensions du pattern pour de grandes structures. De plus, les microstructures du PDMS ont tendance à s'affaisser si le ratio d'aspect (défini comme le rapport entre sa longueur/hauteur et sa largeur) est trop important (par exemple, dans le cas de microcanaux trop profonds et une chambre très étroite). Le PDMS n'est pas compatible avec tous les solvants et produits chimiques. Certains solvants organiques peuvent faire gonfler le PDMS altérant les dimensions de la puce microfluidique (J. N. Lee, Park, et Whitesides 2003). C'est particulièrement le cas pour les solvants organiques non polaires, tels que le xylène qui peut être utilisé pour la clarification des échantillons biologiques après

fixation des cultures cellulaires. Enfin et surtout, avec ses propriétés hydrophobes, il a tendance à absorber certaines molécules de petites tailles (<500g/mol) pouvant parfois induire un biais expérimental en modifiant les concentrations de petites molécules. Il y a aussi un risque d'absorption de certains candidats médicaments (petites molécules, hydrophobes ou lipophiles) qui peuvent éventuellement compromettre la précision des mesures expérimentales (Toepke et Beebe 2006).

#### *2.3.2.2 Fabrication stratifiée*

La fabrication stratifiée est un autre procédé massivement utilisé pour la réalisation de dispositifs microfluidiques pour une large variété d'applications. Elle permet la réalisation de dispositifs à plusieurs étages (typiquement de 3 à 12) ou des polymères tels que le Polycarbonates, PMMA ou COC et des adhésifs ainsi que du verre sont assemblés ensembles pour des besoins spécifiques en design, biocompatibilité et accès optique.

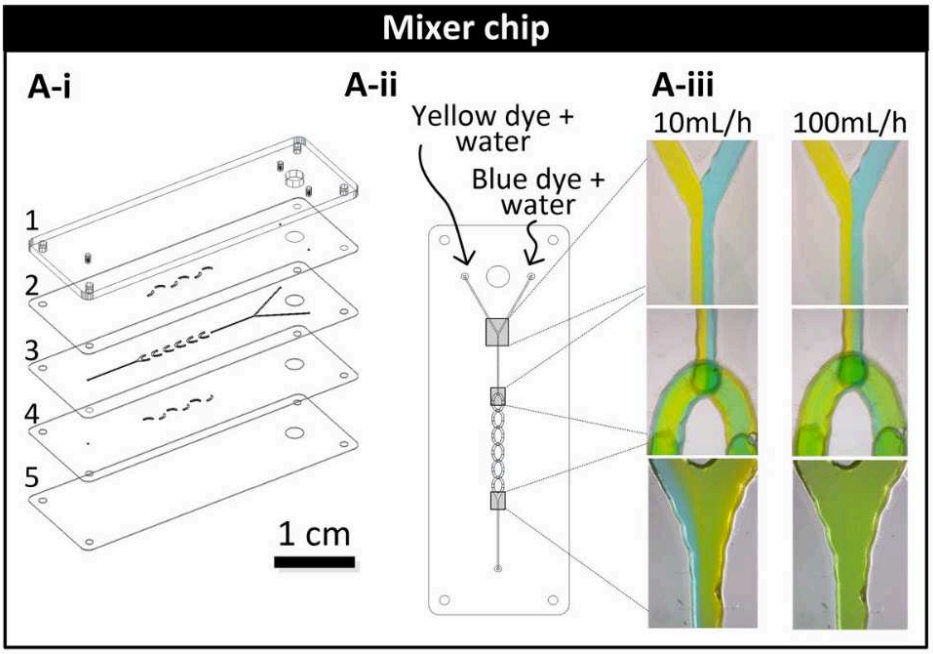



*Figure 15 Dispositif microfluidique mélangeur. Vue éclatée du design de la puce à cinq couches en PMMA (A-i). Vue de dessus de la puce assemblée (A-ii) où les zones grises correspondent aux fenêtres de visualisation. Exemple de mélange obtenu pour deux débits (10 mL/h et 100 mL/h) à trois emplacements de la puce (A-iii). Tiré de (Liga, Morton, et Kersaudy-Kerhoas 2016).*

Chaque couche de ces dispositifs microfluidiques est d'abord conçue en utilisant un logiciel de conception (CAD) avant d'être fabriquée par des méthodes de micro-fabrication mécaniques

ou énergétiques telles que décrite ci-dessus (voir partie 2.2). Enfin, toutes les couches fabriquées sont parfaitement alignées avant d'être associées ensemble en utilisant des procédés de collage appropriés, tels que le collage thermique (Baldan 2012). Cette solution peu couteuse a cependant l'inconvénient d'être lente et de déformer le PMMA. Le collage par adhésif est également couramment utilisé pour sa simplicité de mise en œuvre et son coût réduit mais cette méthode limite la qualité optique en augmentant le risque de non-compatibilité chimique ou de présence de solvant toxique (Brown et al. 2006).

Bien que la stratification puisse être optimisée pour réduire les coûts et augmenter la vitesse de production, elle présente des inconvénients, tels que la déformation du PMMA sous certaines conditions et l'utilisation d'adhésifs qui peuvent affecter la qualité optique et introduire des solvants toxiques, compromettant ainsi la compatibilité chimique. En revanche, le PDMS, bien que plus coûteux et lent à produire à grande échelle, offre une meilleure transparence optique, une souplesse pour la création de microcanaux complexes, et une compatibilité biologique élevée, mais sa faible rigidité et son adsorption de biomolécules limitent son utilisation dans certaines applications. Ainsi, le choix entre les deux méthodes dépend des priorités spécifiques, la fabrication en PMMA étant plus adaptée à la production rapide et multi-étages, avec un objectif de standardisation tandis que le PDMS reste préférable pour les applications nécessitant une compatibilité biologique et une souplesse de conception.

#### *2.3.2.3 Considérations pour la fabrication*

La fabrication de dispositifs microfluidiques en polymères peut donc être réalisée par une large palette de techniques de micro-fabrication, que ce soit pour des prototypes en petites quantités ou des volumes industriels avec une grande variété de matériaux. Le choix de la technique de fabrication dépend, évidemment, de la question scientifique adressée et doit tenir compte des dimensions microscopiques atteignables par chaque procédé, ainsi que des propriétés fluidiques et mécaniques des matériaux utilisés. De plus, les aspects de volume à fabriquer, d'optimisation économique ainsi que de la maîtrise des dispositifs fabriqués sont cruciaux. Il est donc essentiel d'assurer un échange constant entre scientifiques et ingénieurs afin de trouver l'approche optimale pour chaque application. Le coût total de la création d'un dispositif microfluidique peut être simplifié en quatre grandes phases : design, fabrication, optimisation des processus, et contrôle qualité (Reyes et al. 2021). Pour un dispositif destiné

à la commercialisation et à la production en grande série, 80% du coût total du développement provient des deux dernières phases. La majorité des recherches académiques se concentre uniquement sur les deux premières phases, car les dispositifs restent souvent au stade conceptuel. C'est pour cette raison que nous avons choisi de détailler uniquement deux procédés de fabrication, la lithographie douce et la fabrication stratifiée, qui sont massivement utilisés pour le prototypage et le test rapide de dispositifs microfluidiques : la lithographie douce et la fabrication stratifiée. Ces méthodes sont privilégiées pour leur facilité de mise en œuvre et leur capacité à reproduire des structures à l'échelle cellulaire. En lithographie douce, le PDMS reste le matériau de référence pour la fabrication d'organes-sur-puces en milieu académique, en raison de sa versatilité, de sa biocompatibilité et de sa facilité d'utilisation. Cependant, ses inconvénients, comme l'absorption non spécifique de molécules et sa difficulté à être standardisé à grande échelle, doivent être pris en compte. Les organes-sur-puces fabriqués par stratification utilisent généralement des matériaux tels que le PMMA, le polycarbonate ou le COC, en raison de leur biocompatibilité, leur faible rugosité de surface, leur transparence et leurs bonnes propriétés mécaniques et chimiques (Liga, Morton, et Kersaudy-Kerhoas 2016).

## 2.4 Contrôle des paramètres biologiques

Les procédés de fabrication des dispositifs microfluidiques offrent donc une grande flexibilité dans la conception de design permettant la modélisation des fonctions physiologiques à récapituler sur ces dispositifs. La reproduction des fonctions physiologiques d'un organe *in vitro* nécessite le contrôle rigoureux de nombreux paramètres tels que le type cellulaire utilisé, le contrôle des flux et la géométrie de la culture. Les organes-sur-puces offrent un ensemble de solutions pour répondre à ces critères (Figure n°16).

Il est possible dans les organes-sur puces d'intégrer des cellules isolées ou des tranches de tissus spécifiques. Dans l'approche organotypique « top-down », des tissus primaires, comme des tranches issues de biopsie ou des organoïdes, sont incorporés dans des puces microfluidiques. Dans l'approche " bottom-up ", des lignées cellulaires, des cultures primaires, ou des cellules souches sont cultivées dans une puce microfluidique vide et se développent pour former un organe-sur-puce.

### 2.4.1 Types cellulaires

L'accès en abondance à des cellules primaires de qualité représente un aspect essentiel des organes-sur-puces. De nombreux types de cellules sont disponibles, présentant chacun leurs lots d'avantages et d'inconvénients. Le but des organes-sur-puces étant de reproduire au mieux la physiologie humaine, les cellules adultes primaires obtenues directement de patients permettent une pertinence clinique inégalable. Néanmoins, ces cellules sont souvent difficiles d'accès par manque de donneur. De plus, la variabilité génétique entre donneurs, ainsi que la difficulté d'isolation de certaines de ces cellules sont des limites à leur utilisation. Les cellules souches pluripotentes (PSC), peuvent être reprogrammées à partir de cellules adultes somatiques humaines, provenant de biopsies peu invasives, comme les cellules de peau. Une fois reprogrammées, ces cellules deviennent des cellules souches humaines pluripotentes induites (hiPSCs) (Shi et al. 2017) qui peuvent, en principe, être différenciées en n'importe quelle cellule du corps humain, tout en restant génétiquement identiques au donneur originel. Cette technologie permet la production reproductible de cellules en utilisant des protocoles robustes, et permet aussi leurs modifications génétiques pour générer des lignées spécifiques. De nombreux organes-sur-puces sont basés sur des modèles hIPSC, utilisés, par exemple, dans le cadre de maladies neurodégénératives (Fanizza et al. 2022), que nous développerons dans le chapitre consacré aux cerveaux-sur-puces. Toutefois les cellules obtenues restent dans un stade immature, « fœtal », dans leurs expressions géniques et leurs phénotypes fonctionnels, ce qui limite leur pertinence comme représentation directe du patient d'origine (Van Den Berg et al. 2019). De plus, un organe étant composé de plusieurs cellules distinctes, il est nécessaire de cultiver plusieurs types de cellules simultanément dans les organes-sur-puces. Chaque population cellulaire doit conserver sa viabilité et ses phénotypes fonctionnels dans un milieu de co-culture optimal. L'optimisation d'un excellent milieu de co-culture est alors indispensable lorsque divers types cellulaires sont co-cultivés dans un même organe-sur-puces ou un multi organes-sur-puces (Picollet-D'hahan et al. 2021). Les avancées récentes en recherche et développement (R&D) dans le domaine des systèmes microfluidiques compartimentalisés sont en pleine expansion, permettant de surmonter les défis liés aux co-cultures. Ils permettent de séparer physiquement les milieux tout en favorisant les interactions cellulaires

par l'utilisation de barrières microporeuses pour permettre de maintenir les conditions spécifiques à chaque population cellulaire (Ramadan, Gourikutty, et Zhang 2020).

### 2.4.2 Contrôle du flux

La géométrie des organes-sur-puces et leurs dimensions microfluidique permettent le contrôle fluidique précis qui n'est pas possible avec les méthodes conventionnelles de culture *in vitro*. Les dimensions micrométriques des structures dans les puces imposent au fluide de s'écouler de manière laminaire (nombre de Reynold Re<<1) permettant la création de gradient contrôlé physique et chimique qui a été exploité pour l'étude de la pousse axonale en établissant des gradients de laminine à travers des microcanaux de 5µm de diamètre pour étudier la réponse de la pousse axonale vers un substrat enrichi. D'autres études sur le même principe ont utilisé des gradients moléculaires pour étudier la migration cellulaire (Prentice-Mott et al. 2013), la réponse à des neurotoxines (Seidi et al. 2011) ainsi que l'analyse des jonctions cellulaires (Chen et Lee 2010). La précision du contrôle fluidique permet aussi l'administration de candidats médicaments et l'analyse de leur efficacité ou toxicité en temps réel, offrant une perspective intéressante pour les essais précliniques (Y. S. Zhang et al. 2017). Enfin, avec la genèse de gradient il est possible de simuler des conditions physiopathologiques spécifiques, comme l'inflammation ou l'hypoxie pour l'étude de mécanismes biologiques pathologiques (Esch, Bahinski, et Huh 2015).

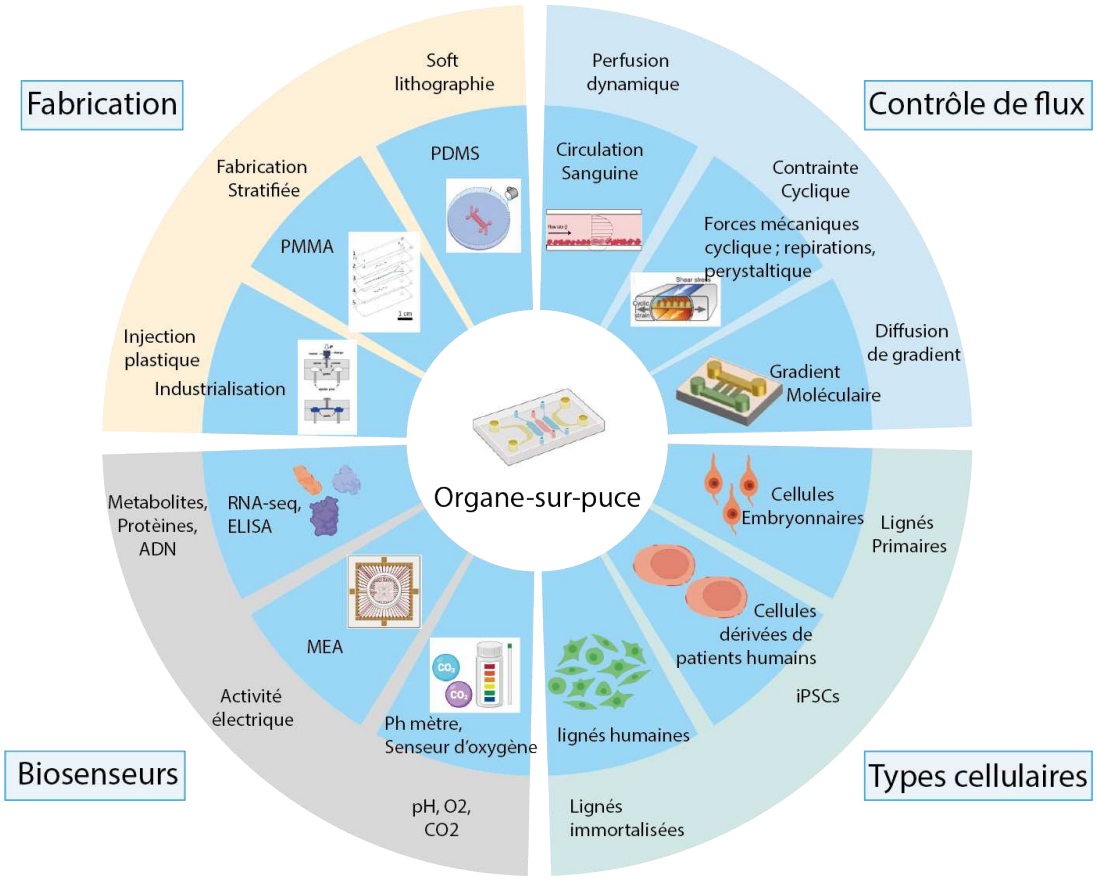



*Figure 16 Quatre aspects essentiels d'un organe-sur-puce. La fabrication, avec ses méthodes les plus utilisées pour le prototypage rapide, comme la soft lithographie et le PDMS, le prototypage en série plus volumineux sans utiliser le PDMS avec la fabrication stratifiée et les polymères, et enfin l'injection plastique pour des puces réplicables en quantité industrielle. Le contrôle fluidique, avec la possibilité de créer des gradients contrôlés à travers des chambres et des microcanaux, la perfusion continue pour simuler, par exemple, la circulation sanguine, ainsi que l'application de contraintes cycliques pneumatiques ou fluidiques. Le tout peut être fait passivement, pour les gradients, ou activement avec du pompage pour les forces cycliques et la perfusion continue. Le choix des types cellulaires, qui permet de réaliser des preuves de concept ou de modéliser la biologie animale avec des cellules primaires, ou d'intégrer la spécificité d'une pathologie ou d'un patient avec des cellules humaines pluripotentes. Enfin, l'intégration de biosenseurs, un avantage capital des organes-sur-puce, pour le contrôle en temps réel des paramètres de la culture, allant de la mesure du pH à l'enregistrement et la stimulation électrique des cellules.*

Enfin, il est aussi possible de réaliser un contrôle de flux gazeux en faisant circuler de l'air dans certains canaux sous pression. Grâce aux propriétés élastomères des polymères utilisés, tels que le PDMS, une déformation mécanique cyclique peut être produite en utilisant des chambres flexibles où des forces sont successivement appliquées pour étirer et relâcher les parois. Ceci permet de simuler, dans les puces microfluidiques, l'exposition des cellules à un stress de cisaillement ou à des forces mécaniques cycliques, similaires à celles expérimentées

par la majorité des cellules dans les organes, notamment par les processus de respiration et de pompage cardiovasculaire péristaltique (D. Huh et al. 2012).

### 2.4.3 Intégration de biosenseurs d'analyses

Un des avantages de de fabrication et de design des organes-sur-puces réside dans possibilité d'intégrer des biosenseurs, permettant la mesure intermittente ou simultanée de différents paramètres cellulaires. Ces mesures facilitent le profilage de l'homéostasie de l'organe reproduit ainsi que l'évaluation des réponses aux stress chimiques ou physiques appliqués. Évidemment, des techniques standards peuvent être utilisées, telles que des dosages d'immunoadsorption enzymatique (ELISA), la spectrométrie de masse ou la chromatographie liquide à haute performance en utilisant des micro-volumes dosés dans les organes-sur-puces. Mais l'intégration de biosenseurs directement dans les organes-sur-puces présente des avantages spécifiques. Ces capteurs permettent notamment de rétrocontrôler la pression fluidique exercée sur des cellules, d'évaluer l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique en mesurant la valeur de la résistance électrique transendothéliale afin de la comparer à la valeur physiologique en condition statique ou perfusion continue (H. J. Kim et al. 2012) (Liu et al. 2013)(Figure N°17 a,b,c) ainsi que la mesure d'une vaste gamme de composés chimiques composant la culture (Glucose, lactate, pH , oxygen) (Douville et al. 2010).

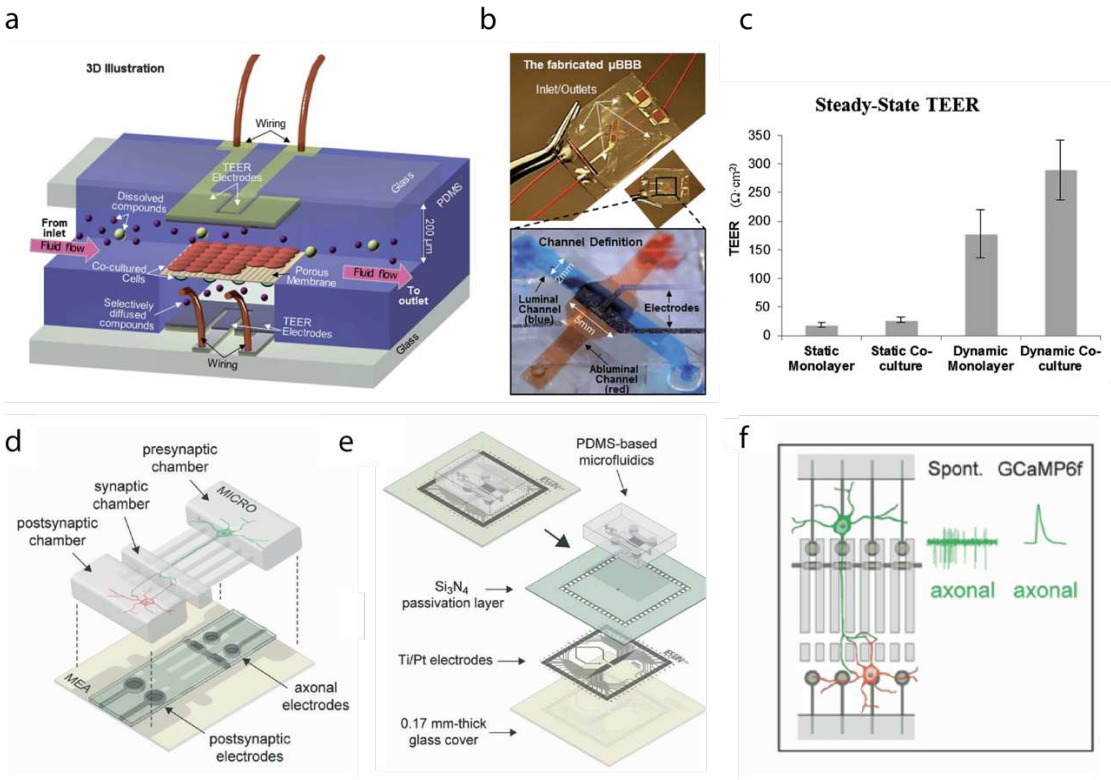



*Figure 17 Différentes techniques d'analyse électrique en temps réel sur des cerveaux-sur-puces. Barrière hémato-encéphalique sur puce avec intégration d'électrodes (a, b) et observation de l'évolution de la résistance trans-endothéliale en perfusion statique et dynamique (c). Adapté de Kim et al., 2012. Matrices de microélectrodes sur puces pour la stimulation d'une population de neurones et la réponse de l'autre population. Schéma isométrique de la fabrication du cerveau-sur-puce en PDMS sur une lame de verre avec des électrodes imprimées (d, e). Des enregistrements de l'activité spontanée ont été réalisés grâce aux électrodes, ainsi qu'à l'aide d'une sonde calcique GCaMP6f (f). Adapté de Moutaux et al., 2018.*

D'autres biosenseurs peuvent être intégrés pour quantifier la fonctionnalité des cellules, tels que l'enregistrement de l'activité électrique neuronale. Les matrices de microélectrodes (MEA), que nous introduisons ici avant le chapitre des cerveaux-sur-puces, (Figure N°17 d,e,f) (Moutaux, Charlot, et al. 2018) sont particulièrement bien adaptées à cette tâche dans des dispositifs de type organes-sur-puce. Les MEA permettent d'enregistrer l'activité électrique de multiples neurones à différents sites, offrant ainsi une vue d'ensemble de l'activité neuronale à l'échelle du réseau. Elles peuvent également stimuler électriquement les neurones afin d'étudier l'impact des impulsions nerveuses sur la fonctionnalité d'un réseau d'intérêt (Lenk et al. 2016). L'utilisation des MEA en conjonction avec des systèmes microfluidiques est très répandue pour l'étude de l'activité de populations neuronales ou de la conduction des potentiels d'action le long des axones, ce qui permet de mieux comprendre les dynamiques de signalisation neuronale dans un contexte physiologique contrôlé. Elles sont compatibles avec la fabrication des dispositifs microfluidiques, car elles peuvent être intégrées directement

dans les substrats de la puce microfluidique, en étant directement patternées sur une lame de verre, là où les cellules neuronales évoluent sur la matrice extracellulaire. En complément, il est également possible de marquer les cellules avec des sondes fluorescentes sensibles à l'activité neuronale, pour visualiser et analyser leur fonctionnalité. Par exemple, dans des modèles de cerveau-sur-puce, des sondes calciques comme le GCaMP (Figure N°XX c), une protéine indicatrice de calcium, sont souvent utilisées. Le GCaMP change de fluorescence en réponse aux variations de calcium intracellulaire, offrant ainsi une image indirecte mais fiable de l'activité électrique neuronale (Grienberger et Konnerth 2012).

### 2.4.4 Limites & Challenges

Malgré leur potentiel évident, les organes-sur-puces se positionnent à l'interface entre la simplicité des cultures cellulaires et la complexité des modèles *in vivo*. Bien que le développement de ces plateformes innovantes soit en pleine expansion, de nombreux défis subsistent. La standardisation et la démocratisation des organes-sur-puces restent des objectifs à atteindre pour en faire une méthode couramment adoptée dans la recherche biomédicale et les essais précliniques. En effet, la pertinence physiologique des organes-sur-puces est encore peu validée par rapport aux organoïdes ou aux autres modèles *in vitro* 3D ce qui ralentit son adoption dans les laboratoires de recherche et qui pousse l'industrie pharmaceutique à continuer les tests sur des modèles plus conventionnels. Ainsi, des validations rigoureuses utilisant non seulement des données animales, mais surtout des résultats d'essais cliniques, sont nécessaires pour déterminer si les organes-sur-puces représentent avec précision la physiologie humaine et fournissent des résultats pertinents concordants avec les résultats cliniques (Huh 2015). De plus, la standardisation des organes-sur-puces est complexe par les méthodes de fabrication des puces limitant leur développement industriel et leur production en masse. En effet, en raison de l'absence de standardisation, l'utilisateur final doit investir du temps et des ressources dans la mise en place du système et des essais, ce qui limite inévitablement le débit expérimental des organes-sur-puces. Il est également nécessaire d'améliorer les matériaux utilisés pour fabriquer les puces, comme trouver des alternatives au PDMS, limité par son absorption non spécifique, sa difficulté d'industrialisation, imitant plus précisément les propriétés des tissus *in vivo (Reyes et al. 2021)*.

De plus, le choix de la source cellulaire demeure un défi. Actuellement, les cultures primaires et les lignées cellulaires immortalisées issues de cellules tumorales offrent des modélisations rapides et des résultats immédiats. Toutefois, ces modèles présentent une utilité limitée aux études biologiques, car leur faible prédictivité les rend inadéquats pour les études précliniques ou les étapes du lead optimisation des candidats médicamenteux. Les cellules humaines induites sont prometteuses, mais leur production et leur différenciation restent complexes et hétérogènes. De plus, il est difficile d'avoir des sources spécifiques des fin de représenter la variabilité interindividuelle et des réponses aux traitements, reste un défi majeur. Bien que la technologie de génération des IPSC améliore encore ces processus, des progrès doivent encore être faits pour garantir des résultats robustes tout en réduisant l'hétérogénéité dans les protocoles de production cellulaire.

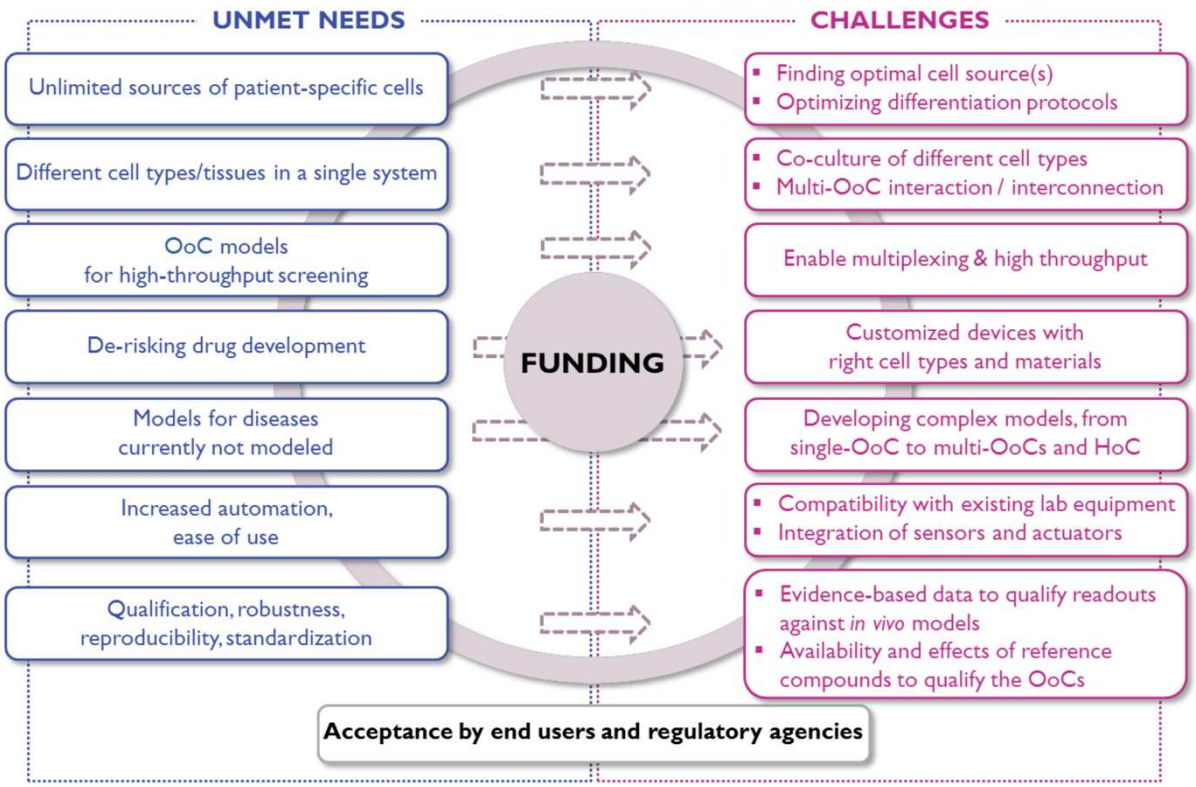



*Figure 18 Besoins non atteints et challenges clés du développement des organes-sur-puces. Tiré de Mastrangeli, 2019 (Mastrangeli et al. 2019).*

Par ailleurs, l'intégration des cellules IPSC dans les organes-sur-puces est en plein essor, cependant, ces systèmes nécessitent encore des ajustements et des validations rigoureuses avant de pouvoir évoluer vers une utilisation standardisée et largement adoptée. Enfin, la majorité des organes-sur-puces souffrent d'un manque de robustesse, de simplicité

d'utilisation et de la rapidité de criblage nécessaires pour produire une grande quantité de données biologiques fiables et reproductibles (Probst, Schneider, et Loskill 2018). Ils sont souvent limités leur rendement faible (low throughput), ce qui freine leur démocratisation dans les laboratoires. En effet, le temps et les ressources nécessaires pour générer des résultats exploitables sur ces plateformes ralentissent leur adoption à grande échelle. Pour que les organes-sur-puces deviennent des outils couramment utilisés dans la recherche biomédicale, des améliorations significatives sont encore nécessaires, notamment pour accroître leur efficacité et leur capacité à fournir des données reproductibles à haut débit. Il est aussi crucial de minimiser la complexité des opérations en développant des systèmes automatisés, ce qui permettra d'augmenter la robustesse, la reproductibilité ainsi que la facilité de transfert de la technologie sans avoir besoin de personnels techniques spécialisés. Les besoins et les challenges sont résumés dans la figure Figure n°18 (Mastrangeli et al. 2019).

## 2.5 Conclusion

Les organes-sur-puce sont des modèles *in vitro* prometteurs, comblant efficacement l'écart entre les cultures cellulaires conventionnelles et les modèles animaux (Leung et al. 2022). Ils sont en voie d'être massivement acceptés et utilisés par la communauté scientifique, car ils offrent des résultats biologiques fidèles et un contrôle sur de nombreux paramètres de culture et d'expérimentation inatteignables avec d'autres systèmes (Vunjak-Novakovic, Ronaldson-Bouchard, et Radisic 2021). Ils peuvent recréer des conditions qui s'approchent de l'*in vivo* à partir de dispositifs *in vitro*, permettant ainsi l'investigation de facteurs cruciaux comme les signalisations biochimiques, les interactions cellulaires, le transport cellulaire, ainsi que les phénomènes endothéliaux et parathéliaux dans des conditions pathologiques, ce qui est un atout majeur pour la recherche biologique de plusieurs disciplines (Farhang Doost et Srivastava 2024).

Les organes-sur-puces ont également le potentiel de jouer un rôle transformateur dans l'étude des mécanismes biologiques de systèmes complexes, tels que les systèmes nerveux, endocriniens, sensoriels et digestifs, dans la modélisation et l'étude de pathologies, dans la prise en compte des spécificités des patients, et dans le développement de médicaments (Esch, Bahinski, et Huh 2015). Le processus de développement médicamenteux implique

souvent des allers-retours entre la modélisation des maladies et les tests sur animaux. La conception et l'intégration des plateformes organe-sur-puce dans la chaîne de développement seraient bénéfiques à toutes les étapes précliniques et permettraient même de réaliser des essais sur puces pour la validation clinique (Blumenrath et al. 2020).

Cependant, malgré l'intérêt grandissant que suscitent les organes-sur-puces, ils sont encore marginalisés dans les laboratoires académiques et l'industrie pharmaceutique. Leur démocratisation et leur translation vers l'industrie pharmaceutique reposent sur de nombreux défis auxquels la technologie organe-sur-puce doit faire face : la standardisation, le multiplexage et la simplification d'utilisation.

## 2.6 Futur des Organes-sur-puces

### 2.6.1 Rôle dans les études préclinique

L'utilisation des organes-sur-puces pour la réalisation d'études biologiques et l'investigation des maladies est une première étape dans la translation vers l'industrie pharmaceutique pour le développement de médicaments (Ma et al. 2021). Il y a de nombreuses étapes distinctes qui composent le pipeline du développement médicamenteux jusqu'aux essais cliniques (Keuper-Navis et al. 2023). Les premières étapes, exploratoire et découverte, sont des étapes qui nécessitent de nombreux tests simples réalisables avec des cultures *in vitro* conventionnelles qui ne requièrent pas spécialement la complexité offerte par les organes-sur-puces. En effet, ces modèles ne sont pas encore compatibles avec le ciblage à haut débit couramment utilisé par l'industrie pharma pour la recherche de nouveaux médicaments. Néanmoins, les organes-sur-puces se relèvent très utiles lors de la sélection de candidats « lead » (Lead Optimization, Figure N°19), en particulier pour les études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (PK/PD). Les organes-sur-puces sont également utilisés pour les études mécanistiques des candidats sélectionnées, en combinaison avec des modèles *in vivo* pour l'entrée en phase clinique.

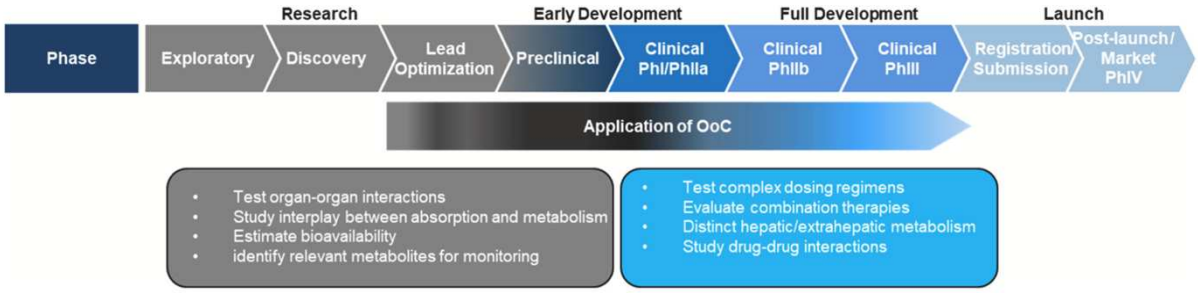



*Figure 19 Application des organes-sur-puces dans le pipeline de développement médicamenteux pour le PK/ADMET. Tiré de Keuper-Navis, 2023 (Keuper-Navis et al. 2023).*

Comme précédemment évoqué, la possibilité de récapituler des fonctions biologiques précises avec des cellules humaines exprimant la pathologie d'intérêt permet une meilleure pertinence des résultats précliniques. Les organes-sur-puces peuvent aussi apporter des informations spécifiques sur des métabolites ou des biomarqueurs qui seront importants de suivre dans la phase clinique (Blumenrath et al. 2020). Enfin, pour des maladies rares où il y a peu, voire aucun, modèles animaux disponibles, les organes-sur-puces offrent une nouvelle solution d'étude physiologiquement pertinente, en modélisant les tissus nécessaires aux études grâce à la génération d'hIPSC adaptées.

Ces avantages peuvent potentiellement diminuer le temps et le coût du développement médicamenteux tout en augmentant les chances de transfert vers les phases cliniques chez l'Homme. Les organes-sur-puce ouvrent de nouvelles possibilités de modélisation physiologique, permettant d'étudier en détail des mécanismes complexes pour des études biologiques et d'optimiser le profil des traitements contre diverses maladies. Grâce à leur pertinence physiologique et à la facilité d'analyse qu'ils offrent, ces modèles améliorent la compréhension des processus biologiques et permettent une exploration plus fine des interactions thérapeutiques. Malgré ces opportunités les organes-sur-puces ne sont toujours pas utilisés de manière routinière dans le développement médicamenteux (Mastrangeli et al. 2019). Leur manque d'accessibilité, leur difficulté d'utilisation liée à une absence de standardisation, leur faible débit de criblage et leur manque de validation par preuve de concept sont les principaux freins à leur translation dans le milieu pharmaceutique et à leur démocratisation dans les laboratoires.

### 2.6.2 Standardisation & Automatisation

Un mouvement vers la standardisation est nécessaire, tant sur le plan industriel que réglementaire, pour assurer l'uniformité et la compatibilité des modules organes-sur-puces produits par différents développeurs, ainsi que des méthodes de travail et d'analyse. Cela permettrait de garantir la reproductibilité des résultats et de faciliter l'intégration des organes-sur-puces dans les processus de recherche et développement. Il est donc nécessaire de concevoir de nouvelles plateformes standardisées, offrant des améliorations significatives en termes de fonctionnalité, d'intégration, d'automatisation et de fabrication, et pouvant être facilement intégrées dans divers laboratoires.

Les plateformes organes-sur-puces devraient s'orienter vers l'automatisation, en visant un meilleur débit de criblage. Multiplexer les plateformes et développer une interface standardisée et facile d'utilisation permettrait d'augmenter la compatibilité des organes-sur-puces avec les expériences biologiques de routine, l'utilisation par du personnel non expert, et les requis du mode de travail de l'industrie pharmaceutique (Ma et al. 2021). Dans une étude pionnière, les auteurs, en utilisant un robot de de pipetage ont réussi à automatiser, par exemple, la culture cellulaire, le couplage fluidique inter compartimental, la collecte répétée d'échantillons et l'imagerie microscopique in situ pendant plusieurs semaines, dans une puce intégrée à huit organes (Novak et al. 2020), montrant une évolution du domaine et l'intégration de nouvelles approches pour l'automatisation.

Mais quels sont les développements technologiques requis pour standardiser l'utilisation des plateformes organes-sur-puces ? Je développerai maintenant les principales caractéristiques souhaitées:

- **Automatisation de la distribution fluidique, en perfusion continue ou non :**

  Pour standardiser l'utilisation des organes-sur-puce, l'automatisation de la distribution des fluides est cruciale. La gestion précise des flux de milieu cellulaire et de fluides physiologiques est essentielle pour recréer les conditions physiologiques. Des systèmes automatisés permettraient de réguler ces flux de manière constante, réduisant ainsi la variabilité expérimentale et rendant les expériences reproductibles. Cette automatisation permettrait également de réaliser des expériences plus complexes, telles que des essais de toxicité ou des modélisations de maladies

chroniques, sans nécessiter une intervention humaine fréquente, ce qui facilite les essais à long terme.

- **Multiplexage des organes-sur-puce au sein d'une plateforme miniature :**

  Le multiplexage consiste à intégrer plusieurs organes-sur-puces unimodal ou multimodal sur une même plateforme. Cette intégration permet d'étudier les effets systémiques des médicaments ou des pathologies, au lieu de se limiter à un seul type cellulaire ou tissu isolé. Ce multiplexage des organes-sur-puces unimodal permettra de réduire le coût et le temps de réalisation des expériences, tout en offrant une meilleure reproductibilité des résultats et un débit expérimental amélioré.

- **Intégration de biosenseurs pour des analyses en temps réel :**

  L'ajout de biosenseurs directement sur les plateformes organes-sur-puces permet de mesurer en temps réel divers paramètres physiologiques et biochimiques, tels que les niveaux de glucose, d'oxygène, de pH ou d'autres marqueurs spécifiques. Ces capteurs offrent une fenêtre continue sur les réponses des cellules ou tissus aux conditions expérimentales, sans avoir besoin d'interrompre l'expérience pour prélever des échantillons. Cela améliore la précision des données collectées et permet une surveillance constante, rendant les résultats plus fiables. Les biosenseurs intégrés ouvrent également la possibilité d'une personnalisation plus fine des traitements en ajustant les conditions en réponse aux changements observés en temps réels dans les tissus étudiés.

- **Compatibilité avec les systèmes d'analyse déjà existants :**

  Pour que les plateformes organes-sur-puces soient adoptées à grande échelle dans les laboratoires de recherche et les industries pharmaceutiques, ils doivent être compatibles avec les systèmes d'analyse déjà en place. Cela inclut des technologies telles que l'imagerie cellulaire, la spectrométrie de masse, la chromatographie ou encore les plateformes de tests biochimiques. Une compatibilité harmonieuse avec

ces outils est essentielle pour permettre une transition fluide vers la démocratisation de la technologie, sans nécessiter d'importants investissements dans de nouveaux équipements ou de longs temps d'adaptation aux nouvelles méthodes. Cela faciliterait également l'analyse et l'intégration des données issues des organes-sur-puces avec celles des méthodes traditionnelles.

- **Minimiser la complexité d'opération, pour permettre le transfert entre les développeurs et les utilisateurs :**

L'un des défis majeurs pour la démocratisation des plateformes organes-sur-puces est la complexité de leur fonctionnement. La simplification des protocoles d'utilisation est essentielle pour garantir que ces systèmes puissent être adoptés non seulement par les développeurs, mais aussi par les utilisateurs finaux, tels que les chercheurs ou les industriels. Cela implique de concevoir des plateformes intuitives, faciles à utiliser, nécessitant peu de formation technique, tout en offrant des résultats fiables. Réduire la complexité opérationnelle permettrait de surmonter une barrière importante à l'adoption de la technologie et de faciliter leur déploiement dans des contextes plus diversifiés, tout en augmentant leur accessibilité pour une large gamme d'utilisateurs.

## 2.7 Plateformes multiplexées

Pour répondre aux besoins technologiques évoqués précédemment, des initiatives et solutions techniques sont en train d'émerger, se concentrant principalement sur le multiplexage d'organes-sur-puces unimodal, en multipliant les puces et en automatisant la distribution fluidique. Je discuterai ici de quelques exemples de développements récents montrant l'évolution des solutions techniques qui commencent à émerger.

Les plateformes et les organes-sur-puces pouvant adopter des architectures variées. *Domansky et al. (Domansky et al. 2010)* ont développé une plaque multi-puits perfusée de 12 bioréacteurs selon les dimensions d'une plaque 96 puits (Figure 20 A). Chaque bioréacteur contient des hépatocytes cultivés au sein d'une matrice de collagène qui sont perfusés en continu. La plaque est fixée sur un module qui intègre directement un système de pompage par membrane flexible se déformant sous l'action d'air pressurisé, contrôlé en dehors de l'incubateur. Ainsi, l'ensemble bioréacteur et pompage reste dans l'incubateur pour maintenir

le milieu et les cellules dans des conditions optimales. Néanmoins, le pompage ne permet que la recirculation en continu du milieu. Ainsi, un pipetage manuel est toujours nécessaire pour changer périodiquement le milieu.

Basé sur une approche de gouttes suspendues, *Frey et al.* (Frey et al. 2014) ont mis au point un système comportant une matrice composée de plusieurs rangées de gouttes suspendues individuellement dans lesquelles des sphéroïdes sont cultivés. Ainsi, et contrairement à un substrat classique solide, la culture des sphéroïdes en gouttes favorise les échanges gazeux. De plus, les gouttes sont connectées à un système de distribution microfluidique qui permet la perfusion continue et multiplexée sur chaque rangée. Les rangées sont soit composées de plusieurs réplicas d'un même type de microtissu, soit de différents types de tissus, offrant la possibilité de résultats multiplexés ou d'expérimentations multitissus (Figure 20 B). Mais ces deux plateformes adressent uniquement le caractère multiplexé des défis des organes-sur-puces et ne proposent pas d'automatisation de distribution fluidique.

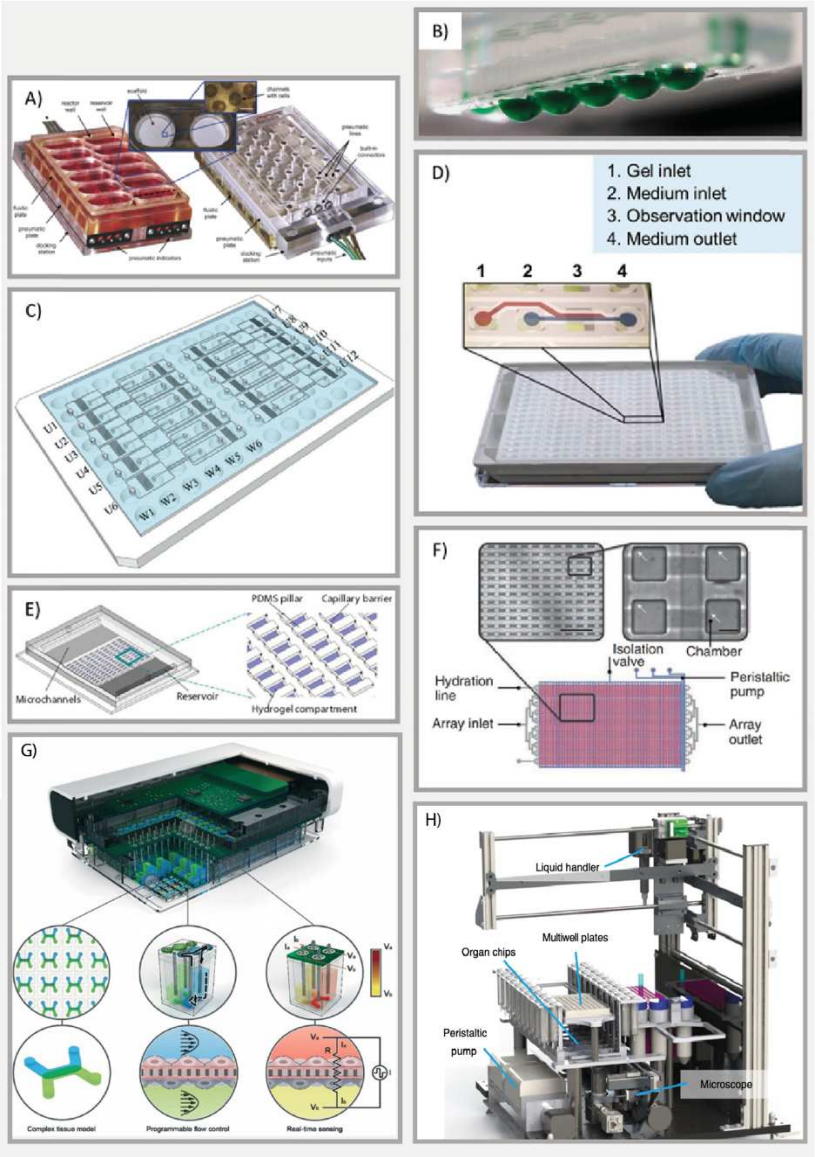



*Figure 20 Exemples de plateformes organes-sur-puces multiplexée existante. (A) 12 bioréacteurs sur une plaque 96 puits pour la culture de cellules hépatiques perfusées par un système de micropompage adapté de Domansky 2010. (B) Système de culture sur goutte microfluidique pour la culture 3D de sphéroïdes, adapté de Frey 2014. (C) 12 réplicats de cellules cultivées dans une matrice d'hydrogel en contact avec un circuit intégré de perfusion sans pompage pour la vascularisation des tissus, adapté de Phan DTT 2017. (D) OrganoPlate™ : modèle à 2 chambres avec 96 réplicats. (E) Matrice de micropiliers pour l'établissement de ponts de matrice d'hydrogel avec 500 réplicats, adapté de Gumuscu 2017. (F) Matrice de chambres de culture microfluidique avec 1600 réplicats et perfusée par pompe péristaltique, réf. 25 Probst. (G) Puce microfluidique bi-compartiment sur une plaque 96 puits connectée à un système de perfusion cyclique de fluide pour la vascularisation de la barrière cellulaire reproduite. (H) Robots de pipetage pour la perfusion automatisée de 8 organes-sur-puces distincts, adapté de Novak 2020.*

Pour étudier la vascularisation sur puce, *Phan et al.* (Phan et al. 2017) ont introduit une plaque vasculaire comprenant 12 puces microfluidiques indépendantes sur la surface d'une plaque 96 puits (Fig. 20 C). Chacune de ces puces est composé de trois compartiments tissulaires en

série dans lesquels des cellules sont cultivées sur un hydrogel. Pour simplifier la mise en place du système, l'injection d'hydrogel est contrôlée automatiquement par un système de pression par vanne à éclatement qui assure la répartition contrôlée de la matrice d'hydrogel, fournissant une base pour l'intégration de processus automatisé. Un autre avantage de ce système repose sur le fait que la perfusion continue est assurée sans système de pompage, mais simplement par une élégante architecture fluidique qui pousse le milieu de culture par écoulement gravitationnel. Néanmoins, au cours de la perfusion, le différentiel gravitationnel évoluant, le débit réel diminue constamment, des opérations de pipetage restent alors nécessaires pour maintenir l'écoulement gravitationnel et changer les milieux de cultures.

L'entreprise MIMETAS a commercialisé la plaque OrganoPlates™ qui permet de paralléliser 96 puces à deux chambres ou 40 à trois chambres, dans lesquels chaque puit (384 au total) peut être manipulé par pipetage manuel. La circulation fluidique se fait par gravité en plaçant la plaque sur un basculeur qui oscille d'une position à une autre entrainant un changement constant de la direction du flux, qui ne reproduit pas physiologiquement la perfusion fluidique et ne propose pas une perfusion à débit constant et maitrisé. De plus, l'architecture de la puce étant fixée et simple, son utilisation reste limitée dans la complexité des fonctions organiques reproduites.

Dans l'optique d'augmenter les capacités de criblage, *Gumuscu et al. (Gumuscu et al. 2017)* ont créé une puce avec cinq cents compartiments d'hydrogel, chargés de cellules, sont disposés entre des rangées de piliers en PDMS. Grâce à la tension de surface, l'hydrogel est confiné entre deux piliers de PDMS. Le milieu de culture cellulaire est ensuite mis en mouvement par pompage parallèlement aux compartiments d'hydrogène permettant une perfusion des cellules. Ainsi ce système offre la possibilité de cultiver 500 tissus individuels en parallèle. Cependant, les auteurs ont observé de la croissance cellulaire hors des compartiments. De plus, la structure des compartiments reste relativement simple, ne permettant pas la reconstruction d'architectures cellulaires complexes inhérentes aux organes. Enfin, les tissus ne sont pas manipulables indépendamment, empêchant la réalisation de tests indépendants sur une même puce (Fig n°20 E).

Le potentiel de multiplexage a été poussé à son extrême par *Lecault et al. (Lecault et al. 2011)*. Dans cette étude, les auteurs ont conçu une matrice parallélisée avec plus de 1600 chambres de culture cellulaire utilisées pour la différenciation et la culture de cellules souches (Fig n°20 F). Si l'architecture fluidique de cette puce permet une manipulation partiellement

indépendante de chaque chambre, son design ne permet pas de reproduire la complexité tissulaire des organes-sur-puces.

D'autres approches proposent d'assembler multiplexage, automatisation et distribution fluidique au sein d'un même dispositif. Par exemple, *Azizgolshani et al.* (Azizgolshani et al. 2021), en partenariat avec l'entreprise Pfizer, ont développé une plateforme automatisée de distribution pour 96 puces à 2 canaux qui reproduisent des barrières cellulaires. Leur dispositif, basé sur les dimensions d'une plaque 96 puits, permet la perfusion continue des cellules avec des micropompes intégrées dans un système de distribution. La plaque 96 puits, compatible avec la microscopie à haute résolution, intègre également des biosenseurs, pour la mesure de la résistance transendothéliale, connectés au système. Néanmoins, le design de la puce reste fixe, et le changement et dosage de milieu doit toujours se faire de manière manuelle.

*Novak et al.* (Novak et al. 2020) se sont concentrés sur le développement d'un complexe pipeteur versatile qui donne une grande liberté sur l'architecture et l'organe-sur-puce d'intérêt. Leur solution intègre un bras pipeteur, un microscope et une station fluidique qui permet la distribution fluidique automatique dans plusieurs organes-sur-puces. Les capacités automatiques du bras robotique qui permet la perfusion et le transfert de milieu entre différents organes-sur-puces ont permis de suivre la distribution d'un traceur de l'insuline perfusé à travers plusieurs organes, simulant un corps-sur-puces, sur trois semaines. Néanmoins, malgré la grande automatisation et versatilité d'application de ce système qui s'intègre dans un incubateur, le dispositif reste massif et incompatible avec l'ensemble des autres systèmes d'analyse présent dans les laboratoires ou les industries.

Ainsi un certain nombre de systèmes déjà existants proposent des solutions pour relever les défis d'intégration et d'automatisation des organes-sur-puces. Comme nous l'avons constaté, les principaux défis adressés par ces plateformes sont le multiplexage des puces, la compatibilité avec les systèmes existants d'analyses et l'automatisation. Néanmoins, dans la littérature, la majorité des plateformes implique d'avoir un design d'organe-sur-puce fixe, limitant leur utilisation pour différents modèles et différentes questions biologiques. Il est aussi important de noter que très peu de plateformes automatisées destinées aux cerveaux-sur-puces ont vu le jour.

## 2.8 Conclusion

Nous avons détaillé comment la technologie des organes-sur-puce permet de reproduire de manière physiologique la microarchitecture complexe des organes et leurs fonctions associées. Grâce à leur flexibilité de conception et à la possibilité d'intégrer des biosenseurs d'analyse, ces systèmes répondent à une large gamme de questions biologiques pertinentes, que ce soit dans des contextes sains ou pathologiques. Bien que de nombreux défis technologiques subsistent, un mouvement vers la démocratisation et l'utilisation croissante des organes-sur-puces en recherche biologique et dans le développement de médicaments est en cours. Des centres de recherche de premier plan, tels que l'Institut Pierre-Gilles de Gennes à Paris, l'Institut de Biologie Humaine à Bâle, ou encore une branche du Wyss Institute à Cambridge, sont entièrement dédiés à leur développement.

Il est probablement nécessaire de souligner ici que qu'il y'a peut-être trop d'engouement autour des promesses liées à cette technologie qui reste une manière simplifiée d'étudier des fonctions biologiques complexes. Les Organes-sur-puces et les plateformes multi-organes-sur-puces deviendront des outils *in vitro* utiles pour la découverte de nouveaux mécanismes biologiques, le développement médicamenteux et la médecine personnalisée. Cependant, ils n'ont pas vocation, et ne pourront pas, remplacer les modèles animaux. En effet, les modèles *in vivo* permettent d'accéder à l'environnement cellulaire complet et complexe des organes, ainsi qu'à leurs interactions et interdépendances. Ces modèles holistiques restent indispensables pour valider les découvertes faites sur des systèmes *in vitro*. Les organes-sur-puce s'inscrivent donc dans une démarche visant à réduire l'utilisation des modèles animaux tout en améliorant la pertinence des résultats obtenus *in vitro*.

Interrogeons-nous maintenant précisément sur l'utilisation de cette technologie pour la création de cerveaux-sur-puces, leurs applications et leur potentiel dans l'étude des réseaux neuronaux.

# 3 Les cerveaux-sur-puces

Le cerveau est un système multi-échelle complexe (Figure N°21), entraînant de nombreux challenges dans la reproduction de ses fonctions dans des systèmes *in vitro*. Les connexions entre les neurones créent une architecture cellulaire unique et extrêmement complexe qui est constamment dans un état dynamique plastique, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre. La fonctionnalité du cerveau est fortement corrélée à l'organisation architecturale précise des axones, ainsi qu'aux « poids » synaptiques des connexions établies. La topographie et la fonctionnalité de ces projections créent des réseaux neuronaux complexes associés à des fonctions biologiques spécifiques. L'état de l'art sur technologie organes-sur-puces nous a permis de comprendre qu'elle offre la possibilité de cultiver différents types cellulaires, tout en reproduisant leur architecture, le contrôle de leur microenvironnement précis et la compartimentalisation des milieux de culture pour la reproduction de fonctionnalités précises et proches de la physiologie.

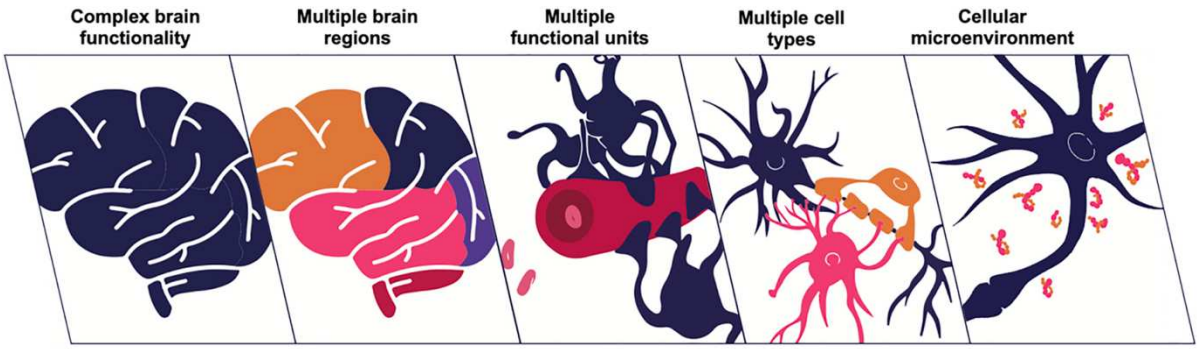



*Figure 21 Le cerveau est un système multi-échelle. Tirée de Maoz 2021 (Maoz 2021)*

Ces caractéristiques sont directement bénéfiques pour la modélisation *in vitro* de certains aspects du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP). De nombreux cerveaux-sur-puces ont été développés ces dernières années (Maoz 2021). A travers ce chapitre nous rentrerons en détail dans la conception des Cerveaux-sur-puces, leurs applications dans les études biologiques et l'étude des neuropathologies, avant de s'intéresser

aux cerveaux-sur-puces spécialisés dans la reproduction et l'étude de réseaux neuronaux, de leur plasticité et tout particulièrement du réseau cortico-striatal.

## 3.1 État de l'art

Les cerveaux-sur-puces, représentent une nouvelle technologie pour modéliser et étudier le cerveau dans un cadre plus proche de la physiologie que les cultures cellulaires conventionnelles. Les cerveaux-sur-puces facilitent l'étude des cellules nerveuses et de la circuiterie neuronale dans un microenvironnement spatialement et temporellement organisé et contrôlé en condition saine et pathologique (Forro et al. 2021). Ils peuvent reproduire l'architecture neuronale de l'échelle sub-micrométrique à l'échelle millimétrique (de la synapse au réseau entier) ce qui permet l'étude *in vitro* à l'échelle moléculaire, cellulaire et tissulaire. Actuellement, les cerveaux-sur-puces trouvent leurs applications principales dans l'étude mécanistique précise des composants neuronaux, la reconstruction de la fonctionnalité des réseaux neuronaux, la modélisation des pathologies et la médecine personnalisée .

Les premières chambres qui ont permis la compartimentation neuronale qui peuvent être qualifié de cerveaux-sur-puces, ont été développées il y a 42 ans par *Campenot et al.* (Campenot 1982). En usinant des pièces en téflon assurant la séparation spatiale et fluidique des axones distaux avec leur corps cellulaire, Campenot a pu reproduire un réseau simple à deux populations neuronales. Dans les années qui ont suivi, et comme précisé au chapitre précédent, l'émergence de techniques de microfabrication comme la lithographie douce a permis de recréer des microarchitectures plus complexes pour la reproduction de réseaux neuronaux sur puce. Ces réseaux sont reproduits sur puce selon une topographie définie qui permet d'étudier des interactions entre la connectivité anatomique et la dynamique des réseaux sur des plateformes simplifiées, permettant des études mécanistiques et fonctionnelles de grande précision.

### 3.1.1 Microarchitecture des cerveaux-sur-puces

Au fil des années, différents cerveaux-sur-puces ont été modélisés. Les différents modèles générés peuvent être caractérisés par leur structure 2D ou 3D et/ou par la nature

des sources cellulaires les composant (Brofiga et al. 2021). Les cerveaux-sur-puces 2D reproduisant des populations neuronales connectées par des microcanaux sont généralement composés de deux chambres avec une perfusion statique ou avec une perfusion fluidique inférieure à 100 µL/h (Taylor et al. 2010; 2005) qui permet l'établissement de gradients moléculaires maitrisés. La dimension des microcanaux connectant les populations neuronales entre elles est contrôlée pour n'autoriser que le passage des neurites et éviter la migration des corps cellulaires qui résulterait en une perte de la compartimentalisation des populations. *Taylor et al.* ont été des pionniers dans l'application des organes-sur-puces en neurosciences (Taylor et al. 2015). Ils ont démontré la faisabilité de cultiver des neurones du cortex primaire en compartimentant les corps cellulaires et les dendrites, tout en guidant la croissance des axones dans des microcanaux. Cette approche permet d'étudier de manière ciblée soit les axones, soit les corps cellulaires avec leurs dendrites, chacun étant accessible dans son compartiment respectif, offrant ainsi un modèle plus précis pour l'exploration des mécanismes neuronaux. Cette architecture simple (Chambre neuronale A –> microcanaux –> chambre neuronale B) peut être déclinée en une vaste gamme de cerveaux-sur-puces en changeant le nombre de chambres, la forme, la taille des microcanaux et les dimensions de l'ensemble. Cette versatilité permet d'aborder différentes questions biologiques ou de reproduire différents réseaux neuronaux (Figure N°21 a). A titre d'exemple, en réutilisant leur design initial, *Taylor et al.* ont reproduit un réseau hippocampo-hippocampal pour l'étude de sa plasticité synaptique.

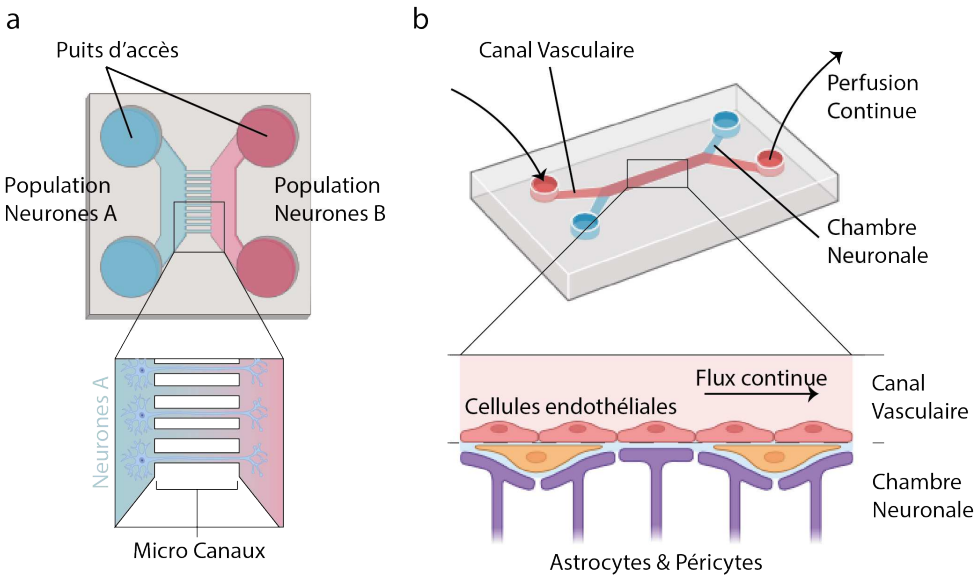



*Figure 22 Cerveau-sur-puce et Barrière hémato-encéphalique sur puces « classique ». (a) Schéma d'un cerveau-sur-puce 2D avec deux chambres neuronales accessibles par les puits d'accès, les neurones étant séparés par des microcanaux autorisant seulement le passage des axones. (b) Barrière hémato-encéphalique verticale sur puce où deux canaux, le canal vasculaire sous perfusion continue et le canal neuronal, sont séparés par une paroi semi-poreuse sur laquelle sont cultivées, d'un côté, des cellules épithéliales cérébrales et, de l'autre, des astrocytes et des péricytes.*

D'autres cerveaux-sur-puces 2D peuvent être utilisés sous perfusion dynamique pour quantifier l'influence d'une perfusion active sur les mécanismes intracellulaires du cerveau. Par exemple, *Kida et al* ont montré que l'utilisation d'un flux pulsé (1 minute de perfusion, 5 minutes de statique) sur des neurones hippocampaux primaires de rat permet une augmentation de la phosphorylation des protéines CREB (Cyclic-AMP response element-biding protein) dont l'activation des voies de signalisation est sensible à ces stimulations impliquées dans la survie neuronale et la formation synaptique (Kida et al. 2002). Ce type d'approche est particulièrement précieux pour comprendre les dynamiques de signalisation neuronale en réponse à des conditions fluidiques physiologiques, comme dans le cas du flux sanguin ou du liquide cérébrospinal.

Ces modèles de cerveaux-sur-puces à perfusion dynamique sont aussi utilisés de manière extensive dans la modélisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les dispositifs BHE-sur puces se composent classiquement de deux compartiments séparés par une barrière semi-poreuse, avec d'un côté des cellules endothéliales microvasculaires sous perfusion continue, et de l'autre, différentes populations cellulaires, telles que les neurones, les astrocytes, ou les péricytes, sous perfusion statique (Dewey et al. 1981) (Figure N°22 b).

Plusieurs études ont montré l'importance d'une perfusion continue dans la chambre contenant les cellules nerveuses microvasculaires endothéliales afin de mieux mimer les BHE-sur-puces, le stress de cisaillement généré par la perfusion permettant d'améliorer l'intégrité des jonctions serrées de la BHE et d'approcher la perméabilité physiologiques (Abbott, Rönnbäck, et Hansson 2006; Prabhakarpandian et al. 2013).

Les cerveaux-sur-puces 2D restent les modèles les plus standards pour les études des mécanismes biologiques. Ils sont des outils robustes pour étudier les réseaux neuronaux et leur mécanisme de plasticité, notamment grâce à leur facilité d'utilisation, de mise en place et les possibilités d'analyses biologiques. Néanmoins, il est possible d'intégrer des cultures neurales 3D sur puces pour gagner en complexité et reproduire des réseaux avec une meilleure hétérogénéité cellulaire et une morphologie plus proche de la physiologie (Brofiga et al. 2021). Les cerveaux-sur-puces 3D évoluant en taille et atteignant l'échelle macroscopique, ils quittent l'appellation de cerveaux-sur-puces liée à leurs dimensions micrométriques et leur aspect 2D pour devenir des bioréacteurs (Cho et al. 2021). Ils peuvent être composés de Sphéroïdes neuronales ou d'organoïdes cérébraux, qui diffèrent dans leurs processus de formation et leurs architectures.

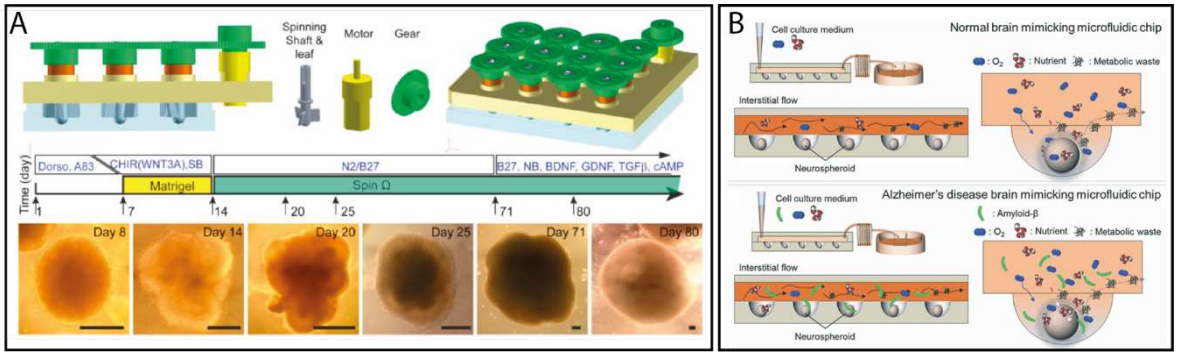



*Figure 23 Exemples de bioréacteurs. (A) Système de bioréacteur avec arbre rotatif permettant le brassage du milieu de culture et le développement des organoïdes sur 80 jours, scale bar 200 µm, adapté de Qian et al. (X. Qian et al. 2016). (B) Plateforme microfluidique pour la circulation des nutriments sur des organoïdes cérébraux et utilisation de la plateforme avec de l'amyloïde beta pour modéliser la maladie d'Alzheimer, adapté de Park et al. (JiSoo Park et al. 2015).*

Je ne me pencherai pas sur les subtilités des cultures 3D en Neurosciences, je préciserai simplement que contrairement aux sphéroïdes, les organoïdes cérébraux permettent d'étudier finement la pousse et la morphologie cérébrale, car ils miment mieux l'organisation

spatiale des différentes populations neuronales. Ainsi, *Qian et al.* (X. Qian et al. 2016) ont développé un système de bioréacteur dans lequel sont plongés des mini-arbres palmés rotatifs permettant le brassage du milieu de culture dans lequel sont cultivés les organoïdes cérébraux, créant ainsi un effet vortex contrôlé. Cette technique de brassage permet d'améliorer la diffusion d'oxygène de nutriments dans les organoïdes, diminuant la nécrose au sein de l'organoïdes, et permettant ainsi une taille et une maturation plus importante. Dans une autre étude, *Park et al.* (Park et al. 2015) ont développé une puce où plusieurs neurosphéroïdes sont cultivés et les projections inter-neurosphéroïdes se sont développées pour former un réseau neuronal 3D. La puce offre un flux constant de fluide, similaire à celui présent dans l'espace interstitiel du cerveau, ce qui permet de mieux étudier les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Les chercheurs ont observé que les neurosphéroïdes cultivés sous flux étaient plus grands et formaient des réseaux neuronaux plus robustes et complexes que ceux cultivés dans des conditions statiques. Cela souligne l'importance du flux pour transporter de manière continue les nutriments, l'oxygène et les cytokines, tout en éliminant les déchets métaboliques. Ils ont également testé les effets toxiques de l'amyloïde-βeta (Aβ), principal facteur de la maladie d'Alzheimer, et ont constaté que la diffusion d'Aβ réduisait significativement la viabilité des neurosphéroïdes et causait une destruction plus importante des réseaux neuronaux, par rapport aux conditions statiques. Ils proposent leur plateforme comme modèle *in vitro* de la maladie d'Alzheimer sur neurosphéroïdes.

Il apparait donc évident qu'il n'y a pas un unique modèle de cerveau-sur-puce / bioréacteur qui permet d'étudier toutes les applications biologiques. Il est nécessaire de développer un modèle adapté à la question biologique traité en :

- 1. Définissant le plus précisément possible l'étude à réaliser ou le problème à résoudre.
- 2. Identifier les paramètres cruciaux qui peuvent influencer les résultats (i.e. perfusion, types cellulaires, matériaux, 2D/3D, etc.)
- 3. Conceptualiser et réaliser la plateforme cerveau-sur-puces adapté à ses besoins.

Dans la suite du chapitre, je me concentrerai sur les applications des architectures cerveaux-sur-puces 2D qui ont été au cœur de mon travail de thèse.

### 3.1.2 Modèles d'études biologiques

La première utilité des modèles cerveaux-sur-puces est naturellement leur utilisation dans l'étude du développement des cellules neuronales, la physiologie des tissus nerveux et de la fonctionnalité des réseaux neuronaux. J'aborderai succinctement la formation d'unité neurovasculaire et les modèles Barrière Hémato-Encéphalique sur puce qui ne concernent que peu mon sujet. Nous détaillerons, ensuite, plus spécifiquement les cerveaux-sur-puces développés pour l'étude du neurodéveloppement et de la plasticité des réseaux neuronaux.

#### *3.1.2.1 Barrière Hémato-encéphalique sur puce*

La Barrière Hémato-encéphalique (BHE), agissant comme un filtre sélectif entre le système circulatoire et le système nerveux central, se compose d'une jonction de cellules endothéliales, de cellules gliales et de péricytes. Ce filtre est extrêmement sélectif et de nombreuses études sont menées pour comprendre le passage ou non de certaines molécules. Son dysfonctionnement chronique est associé au développement de nombreuses maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de parkinson, la sclérose en plaque, le syndrome de Rett (Zlokovic 2008). L'étude de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est essentielle pour le développement de médicaments destinés à traiter des affections du système nerveux central, cette barrière sélective protège le cerveau en régulant le passage des molécules. Pourtant, la BHE représente également un obstacle pour les médicaments, en raison de sa nature restrictive, des efforts particuliers sont nécessaires dans le développement des molécules thérapeutiques pour qu'elles puissent la franchir. De plus des études ont montré que les altérations de la BHE peuvent influencer la distribution, la concentration et l'efficacité des médicaments dans le cerveau. Par exemple, une BHE compromise peut permettre une pénétration accrue de certaines molécules toxiques ou inflammatoires, tout en modifiant la réponse à des traitements pharmacologiques spécifiques. Il est donc nécessaire d'avoir des modèles d'études de BHE saines et altérés pour l'étude et le développement de nouveaux traitements (Karmur et al. 2020).

Il existe dans le domaine un design de puce prédominant pour la reproduction de la BHE sur puce. Composé d'un empilement vertical de deux chambres séparées par une barrière semi-

poreuse, ce modèle a été utilisé pour étudier le développement et l'intégrité de la BHE en évaluant et retrouvant des valeurs physiologiques de la résistance électrique transendothéliale avec des électrodes directement installées dans la puce (Jeong et al. 2018). *Bang et al.* (Bang et al. 2017) ont par la suite augmenté la complexité du modèle BHE sur puce en développant un dispositif composé de deux canaux fluidiques mimant respectivement le milieu interne neuronal et externe vasculaire (Figure n°24)

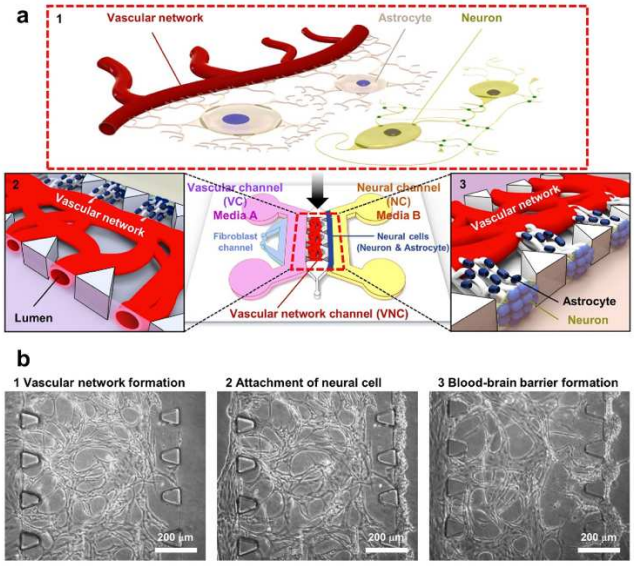



*Figure 24 Plateforme neurovasculaire sur puce. Schéma du fonctionnement de le puce avec les différents types cellulaires (a). Microphotographie de l'évolution de la mise en place de la barrière Hémato-encéphalique sur puce (b). Tirée de Bang et al 2017.*

Le milieu interne est directement en contact avec les cellules neuronales et gliales tandis que le milieu externe alimente une unité vasculaire en 3D présentant une perméabilité physiologique. Cette puce représente une reconstruction relativement fidèle de la physiologie de la BHE, permettant d'étudier sa dynamique et sa perméabilité en conditions pathologiques, condition indispensable pour le développement de candidats médicaments efficaces.

#### *3.1.2.2* Étude du développement et remodelage neuritique

Comprendre la genèse axonale et dendritique jusqu'à la formation d'une synapse fonctionnelle, et plus particulièrement, leur croissance guidée jusqu'à leur cible, est un processus clé dans l'établissement de la communication neuronale pendant le développement ou lors d'un traitement. Le guidage axonal est modulé par de nombreux

signaux chemo/hapto-attractifs, et dépend également de l'interaction avec les matrices extracellulaires. Le cône de croissance, qui guide la formation de l'axone, convertit ces signaux extracellulaires pour s'orienter (Kalil et Dent 2005). Certaines études visant à déterminer les mécanismes régulant ces dynamiques ont utilisé des dispositifs cerveaux-sur-puces (Kilinc, Blasiak, et Lee 2015). Nous nous intéresserons plus particulièrement à ces études dans la suite de ce chapitre.

Anne Marion Taylor, pionnière dans le domaine des puces en neurosciences, a utilisé une puce simple à deux chambres séparées par des canaux (Taylor et al. 2005) afin de démontrer que les dendrites des neurones primaires du cortex ne poussent pas au-delà de 450 µm. Dans leur étude de 2005, les auteurs ont développé une puce composée de microcanaux longs de 500 µm, permettant d'isoler les axones dans la chambre opposée. Ils ont également exploité le caractère compartimenté des cerveaux-sur-puces pour léser les axones sans impacter les corps cellulaires, afin d'étudier les mécanismes de repousse et de régénération axonale. Une étude très récente a reproduit un réseau unidirectionnel avec des iPSCs humaines différenciées en neurones glutamatergiques et gabaergiques, pour étudier la repousse axonale à la suite d'une lésion. Les auteurs ont mis en évidence que la régénération des axones glutamatergiques varie en fonction des lignées utilisées et de la présence ou non de neurones du striatum dans le compartiment distal. Cette étude a également mis en évidence le rôle crucial du facteur neurotrophique BDNF dans la régénération axonale (Nebuloni et al. 2024).
Une étude s'intéressant à l'effet d'un gradient de molécules pour le guidage axonal, a utilisé une plateforme multiplexée de 16x64 chambres microfluidiques dans lesquelles des neurones d'hippocampe murin sont soumis à un gradient linéaire de netrin-1, une protéine impliquée dans le guidage axonal. L'étude a pu mettre en évidence la relation entre la concentration de netrin-1 et la directionnalité des axones attirés par le côté où la concentration en Netrin est la plus forte (Bhattacharjee et Folch 2017) (Figure n°25 A). Des forces mécaniques peuvent aussi être utilisées pour polariser la puce axonale. Par exemple, l'utilisation d'un champ électrique alternatif entre des électrodes à l'intérieur d'une puce peut stopper la pousse axonale si le cône de croissance se trouve entre les électrodes (Honegger et al. 2013a).

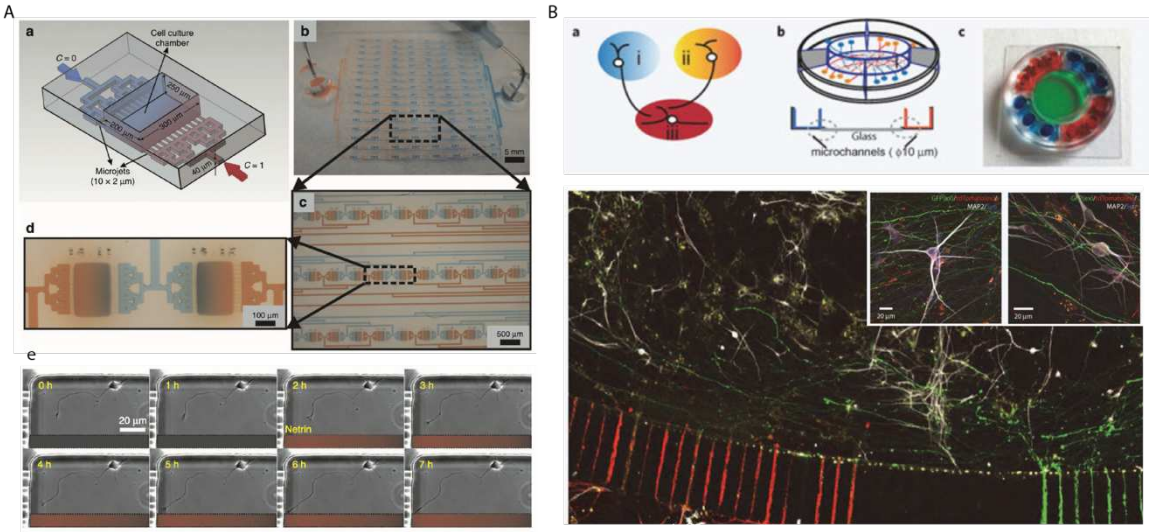



*Figure 25 Exemples de cerveaux-sur-puces pour des études biologiques. Puce multiplexée pour la diffusion d'un gradient de netrin-1 (A : a, b, c, d) sur des neurones d'hippocampe murins et évolution de la croissance axonale sur 7h (A : e). Adapté de Bhattacharjee et al., 2017. Puce à 5 compartiments pour la culture compartimentalisée de neurones (B : a, b, c) dans le but d'étudier la formation de synapses, marquées avec SYN (bleu), avec la population centrale marquée en MAP2 (blanc), les axones excitateurs des populations neuronales distinctes marqués en tdTomato (rouge) et GFP (vert) (B). Adapté de Fantuzzo et al., 2017.*

#### *3.1.2.3 Synaptogenèse*

La formation et la fonctionnalité des synapses peuvent être modélisées sur puce en guidant les axones d'une population neuronale vers les dendrites de neurones cibles, situés dans une autre chambre fluidiquement isolée, connectée par l'intermédiaire de microcanaux. Pour étudier la fonctionnalité de ces synapses, une stimulation peut être induite dans une chambre neuronale et la réponse de l'autre chambre enregistrée. Par exemple, une étude a utilisé une stimulation chimique par dépolarisation au chlorure de potassium (KCl) de la chambre présynaptique afin d'enregistrer la réponse induite dans la chambre postsynaptique dans une co-culture de neurones hippocampaux primaires (Robertson, Bushell, et Zagnoni 2014). Les auteurs ont observé une augmentation significative des événements calciques dans les neurones et astrocytes de la population connectée. Cette méthode propose une plateforme *in vitro* innovante pour étudier la connectivité synaptique fonctionnelle et peut être utilisée pour tester des composés ou modéliser des maladies *in vitro*. La compétition synaptique, cruciale dans l'établissement de connexions pertinentes, a été étudiée sur un cerveau-sur-puce avec un dispositif à trois compartiments où deux populations neuronales de cortex de rongeur se connectent à une même population cible. L'étude a montré que

l'inhibition de l'activité d'une population corticale par un antagoniste du récepteur GABA entraîne une augmentation du nombre de synapses et l'élongation des terminaisons axonales de la population corticale non inhibée. De manière surprenante, leurs résultats montrent que cette plasticité dépend principalement du nombre de jours *in vitro* de la population centrale et non des populations corticales qui projettent leurs axones (Coquinco et al. 2014).

Pour représenter la complexité des connexions synaptiques présentes dans le cerveau et étudier leur hétérogénéité, *Fantuzzo et al*. (Fantuzzo et al. 2017) ont créé un modèle de cerveau-sur-puce circulaire à cinq compartiments où quatre d'entre eux connectent un grand compartiment central accessible pour des analyses électrophysiologiques (Figure n°25 B). Les auteurs ont utilisé des cellules souches pluripotentes induites humaines pour créer des populations excitatrices (glutamatergique), inhibitrices (GABAergique) et neuromodulatrices (dopaminergique). Chacune de ces populations projette sur la même population centrale. Selon les auteurs, cette puce permet d'étudier des dynamiques de plasticité complexes prenant en compte les spécificités cellulaires des souches de cellules souches pluripotentes et pourrait être utilisée pour l'étude de la plasticité synaptique dans la maladie de Parkinson avec la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

#### *3.1.2.4 Reconstruction d'un réseau neuronal-sur-puce*

La modularité des réseaux cérébraux est un aspect crucial de leur fonctionnement et de leur adaptation, comme nous avons pu en discuter dans le **premier** chapitre. La reproduction et la manipulation de cette modularité grâce aux cerveaux-sur-puces permettent d'étudier des mécanismes fins pour la compréhension de l'évolution fonctionnelle et anatomique des réseaux. Les cerveaux-sur-puces, par leur architecture composée de microcanaux et de chambres compartimentalisées permettent de reconstruire la topologie des réseaux neuronaux en reprenant les principaux éléments de la théorie des graphes (Millet et Gillette 2012), avec les populations ou sous-populations neuronales compartimentalisées qui représentent les sommets, et leurs projections axonales représentant les arêtes (Figure n°26 A). Une première étude a utilisé des techniques de microfabrication pour patterner une couche d'agarose répulsif et permettre le développement d'un réseau neuronal en « grille », permettant la création *in vitro* d'un réseau multimodal (Vogt et al. 2005). Les auteurs ont pu suivre l'évolution de la fonctionnalité du réseau grâce à une matrice de microélectrodes placée sous chaque populations neuronales, mesurant l'activité électrique des neurones. Leur travail

a servi de preuve de concept au design d'un réseau neuronal multi-acteurs et à l'étude de sa fonctionnalité (Figure n°26 C). Ils ont démontré la croissance d'un réseau neuronal sur un motif prédéfini afin d'étudier la plasticité synaptique et l'évolution de la connectivité du réseau. Cependant, la "grille" utilisée pour structurer la disposition des neurones était réalisée par microimpression de matrice extracellulaire, qui perd son intégrité au cours de la culture, fragilisant ainsi la géométrie du réseau préétabli. De plus, l'unidirectionnalité des connexions neuronales n'était pas abordée. Comme nous l'avons vu dans le **chapitre 1.1**, le cerveau est composé de réseaux avec des patterns de projections unidirectionnels qui doivent être reproduites *in vitro*. Ainsi, plusieurs stratégies ont émergé pour former des réseaux présentant une unidirectionnalité. *Pan et al*. (Pan et al. 2015) ont conçu une puce en PDMS à quatre compartiments séparés par des microcanaux, formant un réseau cortico-cortical interconnecté. Les auteurs ont mis en évidence une corrélation directe entre le nombre de microcanaux séparant deux populations et le degré de connectivité entre elles (Figure n°26 D). Ils ont conclu qu'un minimum de 100 microcanaux de 5 µm de large est nécessaire pour assurer une connectivité robuste. Pour reproduire l'unidirectionnalité des projections axonales d'une population neuronale vers une autre, les auteurs ont laissé un délai de sept jours entre l'ensemencement des deux populations. Ainsi, avec cet ensemencement séquentiel, la première population envahit et obstrue les microcanaux, empêchant le passage des axones en croissance de la seconde population, qui a été ensemencée sept jours plus tard (Figure n°26 F).

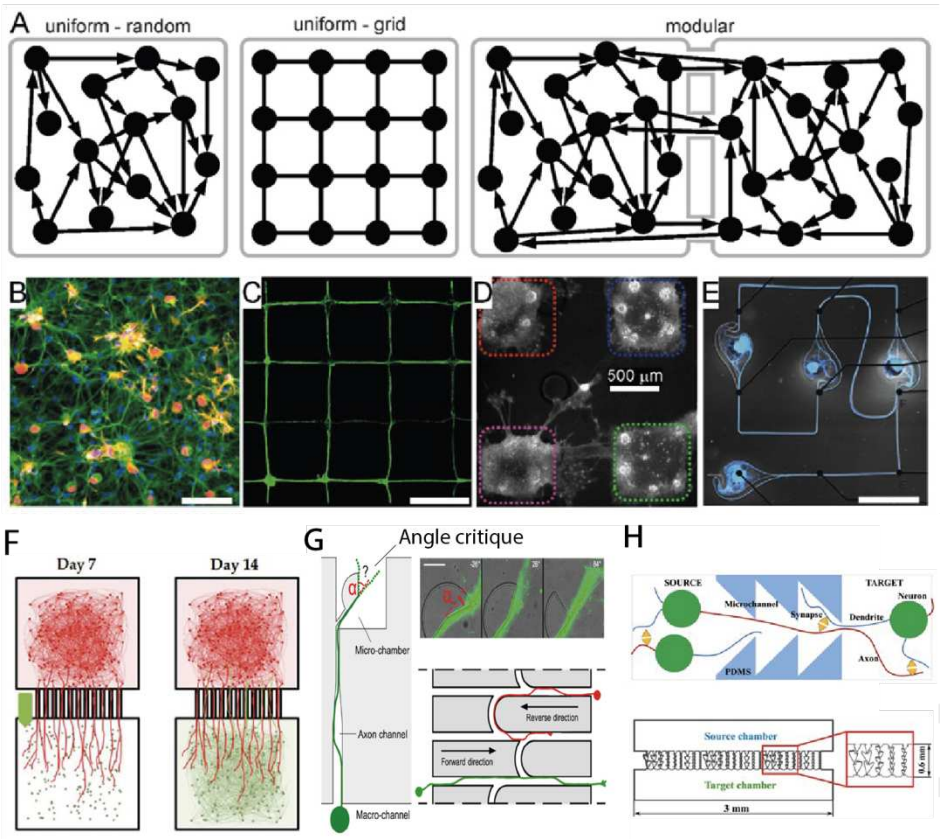



*Figure 26 Reconstruction de réseaux neuronaux sur puces et exemple d'unidirectionnalité des projections. (A) Différents schémas de l'organisation des réseaux sur puces. (B) Culture d'hippocampes in vitro classique sans organisation neuronale. (C) Culture de neurones corticaux en grille Voght et al. 2005. (D) Réseau neuronal à 4 acteurs, adapté de Pan et al. (E) Réseau à 4 acteurs unidirectionnel, adapté de Forro et al. 2018. (F) Stratégie de création d'un réseau unidirectionnel avec un ensemencement différentiel des populations. (G) Investigation de l'angle critique du guidage par les bords des microcanaux et design en arches, adapté de Renault et al. 2016. (H) Architectures complexes de microcanaux pour créer l'unidirectionnalité des projections, adapté de Gladkov et al. 2017.*

Cette stratégie permet d'obtenir une bonne directionnalité d'un réseau neuronal, mais impose une différence d'âge entre les populations cellulaires, ce qui limite le nombre de nœuds possible pour réaliser des réseaux multimodaux. Pour éviter l'ensemencement séquentiel, d'autres études ont exploré la directionnalité des réseaux en développant des diodes axonales, modifiant la géométrie des microcanaux afin de permettre le passage des projections dans un seul sens. Le guidage des neurites est fortement favorisé par leurs interactions avec la géométrie tridimensionnelle des microcanaux. *Renault et al*. ont ainsi mis en évidence deux mécanismes qui dirigent la direction des axones dans les microcanaux : l'effet d'angle critique (un virage supérieur à 72 degrés) et l'effet de guidage par les bords (Renault et al. 2016) (Figure n°26 G). Ces mécanismes permettent de guider la croissance des axones, voire de les piéger, simplement en jouant sur la géométrie des microcanaux. Par

exemple, des microcanaux coniques exploitent l'effet d'angle critique pour empêcher la population cible d'y pénétrer (Peyrin et al. 2011), tandis que des répétitions d'arches profitent de l'effet de guidage par les bords, en reroutant les axones de la population cible sur elle-même (Figure n°26 G). Des formes triangulaires ou en harpons combinent ces deux effets pour piéger les axones de la population cible à l'aide de l'effet d'angle critique dans des « cul-de-sac » (Gladkov et al. 2017; Forró et al. 2018) (Figure n°26 E,H). Grâce à ces conceptions unidirectionnelles, *Forró et al*. ont pu créer un réseau multimodal unidirectionnel modulable, offrant un outil précieux pour l'analyse des réseaux neuronaux *in vitro*, en ajustant des paramètres tels que la quantité de neurones dans une population, la longueur des microcanaux ou encore la nature excitatrice ou inhibitrice des nœuds (Figure n°27).

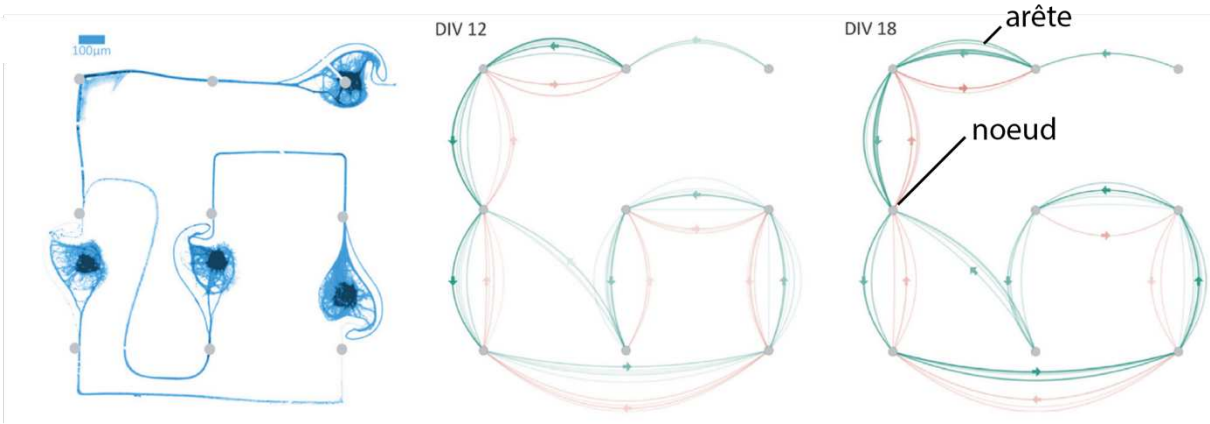



*Figure 27 Réseau multimodal unidirectionnel et bouclé à 12 jours et 18 jours après la culture (DIV 12, 18) de neurones excitateurs primaires de rats. Adapté de Forro et al.*

Ces approches offrent la possibilité de reconstruire des réseaux bimodaux ou multimodaux directionnels, ouvrant la voie à la reproduction de réseaux impliqués dans des pathologies cérébrales. Cependant, elles restent limitées à une interprétation simplifiée de la théorie des graphes, en modélisant les nœuds comme des populations neuronales et les arêtes comme des microcanaux directionnels, sans prendre en compte l'organisation topographique des projections qui émerge au sein d'un même noyau cérébral, comme nous l'avons détaillé dans le **chapitre 1.2.1** concernant la topographie précise des projections corticales sur le striatum. Dans la suite de ce chapitre, nous abordons la modélisation du réseau cortico-striatal sur puce avant de revenir sur ce point crucial.

## 3.2 Reconstruction du réseau cortico-striatal sur puce

Le réseau cortico-striatal présente des caractéristiques anatomiques et fonctionnelles complexes, comme évoqué dans le **chapitre 1.2.1**. Ce réseau est impliqué dans de nombreuses fonctions centrales, telles que le développement adéquat de la motivation, la cognition, les émotions, et les compétences motrices. C'est un réseau unidirectionnel où différentes aires corticales envoient massivement des projections glutamatergiques sur le striatum. De plus, ces projections n'envahissent pas le striatum de manière désorganisée mais suivent une topographie extrêmement complexe. Ainsi, la reproduction sur puce de ce réseau clé représente un défi majeur. À ce jour, seulement un petit nombre d'études se sont intéressées à la reconstruction du réseau cortico-striatal sur puce. La majorité d'entre elles se base sur le design de puce développé par *Taylor et al.* en 2010 (Taylor et al. 2010), qui est une puce à trois compartiments, composée d'un compartiment présynaptique (peuplé de neurones corticaux), d'un compartiment synaptique où se connectent le cortex et le striatum, et d'un compartiment postsynaptique (peuplé de neurones du striatum). Il est important de constater que dans ce design, l'unidirectionnalité des projections n'est pas directement adressée. Dès 2014, *Deleglise et al. (Deleglise et al. 2014)* ont développé sur ce design un réseau cortico-striatal en utilisant des cultures primaires d'embryons murins pour l'étude de la plasticité synaptique lors d'une lésion des axones corticaux. Ils ont adressé l'unidirectionnalité des microcanaux en utilisant un design en cône pour empêcher les projections des neuronaux striataux de remonter dans le compartiment cortical. Ils ont pu mettre en évidence l'existence d'une dynamique rapide de déconnexion des synapses présynaptiques des projections corticales sur les dendrites striatales lors de l'axonotomie des axones corticaux. De plus, ils ont utilisé cette plateforme pour étudier les effets de plusieurs molécules synaptoprotectrices. Ce réseau cortico-striatal sur puce est une des premières tentatives pour reproduire son unidirectionnalité sur puce (Deleglise 2013) (figure n°28 A).

En utilisant le design tricompartimental de Taylor, *Moutaux et al.* (Moutaux, Christaller, et al. 2018) ont reconstruit un réseau cortico-striatal où des connexions axo-dendritiques unidirectionnelles du cortex vers le striatum ont été observées dans la chambre synaptique. Ce cerveau-sur-puce a été utilisé pour étudier les dynamiques intracellulaires lors de la maturation du réseau, permettant d'identifier différents stades de maturité, caractérisés par les dynamiques du trafic axonal grâce à la compartimentation des canaux. Il a également permis de suivre l'activité calcique du réseau. Cela souligne l'intérêt des cerveaux-sur-puces

pour étudier de manière précise les mécanismes sous-jacents dans les réseaux en développement et matures (Figure n°28 B).

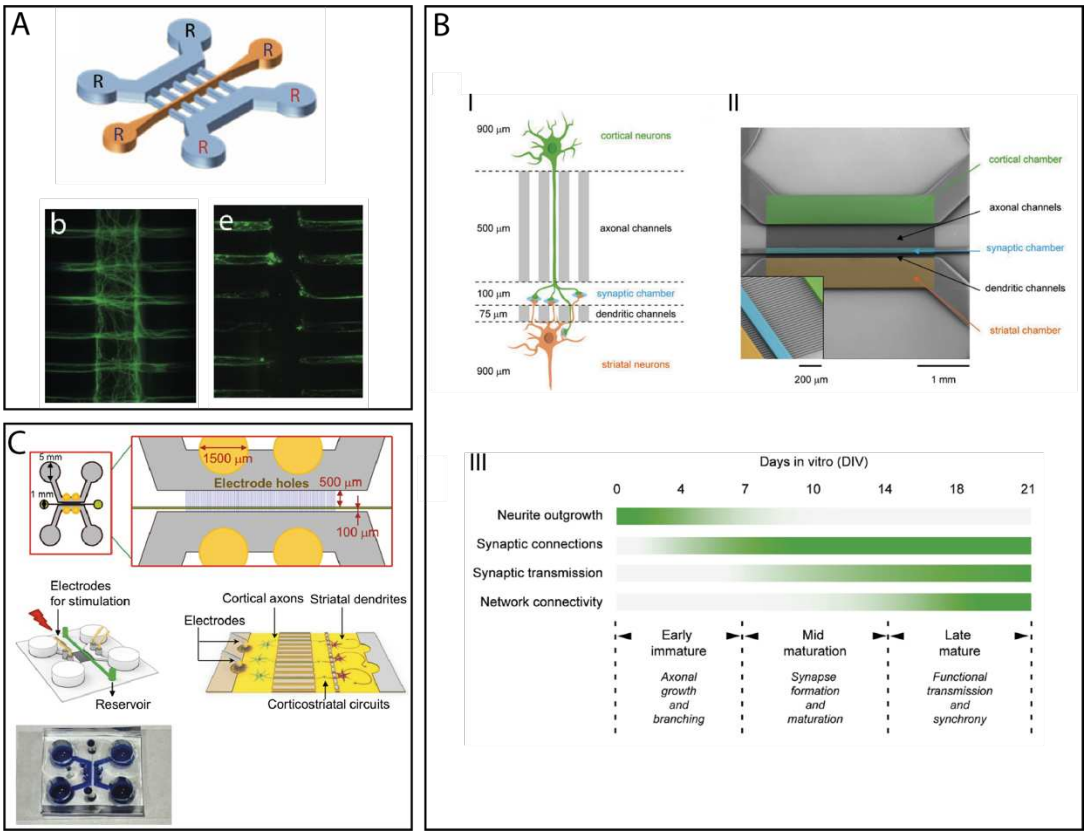



*Figure 28 Reconstruction du réseau cortico-striatal sur puce. (A) Axonotomie des axones corticaux (d), (e). Adaptée de Deleglise et al. (B) Réseau cortico-striatal sur puce pour l'étude de la maturation du réseau et du trafficking axonal. Adaptée de Moutaux et al. (C) Modulation de l'activité électrique du réseau cortico-striatal sur puce. Adapté de Han et al.*

La même année, *Lassus et al*. (Lassus et al. 2018), utilisant le même design de puce, ont exploré et enregistré les modulations de l'activité rythmique du réseau cortico-striatal mature reconstruit sur puce. Ils se sont intéressés aux rôles des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 dans la modulation des fréquences, du rythme et de la synchronie du réseau. Ils ont montré que la synchronie du réseau cortico-striatal est modulée par les récepteurs D2. Leur plateforme permet donc d'étudier les mécanismes des récepteurs dans un contexte pathologique, comme la maladie de Parkinson, où la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire entraîne une réduction de la dopamine disponible pour activer les récepteurs D2 dans le striatum. Les récepteurs D2, particulièrement impliqués dans la voie indirecte qui inhibe l'activité motrice, deviennent hyperactifs en l'absence de dopamine, aggravant les déficits moteurs. *Moutaux et al*.

(Moutaux et al. 2018) ont conçu un réseau de microélectrodes adapté à la chambre utilisée dans leur étude précédente afin d'étudier les dynamiques calciques axonales et postsynaptiques selon des protocoles de stimulation électrique pour induire la LTP ou la LTD en modulant la fréquence des stimulations. Ils ont mis en évidence le lien entre l'augmentation de la fréquence de stimulation et l'augmentation du nombre de neurones postsynaptiques répondant dans le striatum. Plus récemment, Han et al. (Han et al. 2023) ont intégré des électrodes dans le design de la puce pour enregistrer et moduler les propriétés physiologiques du circuit cortico-striatal sur puce (Figure n°28 C). Ils ont utilisé des indicateurs calciques et différents protocoles de stimulation pour mesurer la transmission synaptique et étudier les dynamiques des vésicules synaptiques. Ces études montrent l'utilité des cerveaux-sur-puces pour étudier les mécanismes fonctionnels des circuits neuronaux, bien qu'elles ne testent pas de pathologies spécifiques et se limitent à la caractérisation fonctionnelle de leurs approches. Enfin, Maisonneuve et al. (Maisonneuve et al. 2022) ont tenté de développer une puce pour une reconstitution complète des ganglions de la base, avec un réseau multimodal à cinq acteurs : cortex, striatum, substance noire, globus pallidus et thalamus. Ils ont corrélé la taille et la densité neuronale des chambres avec les noyaux cérébraux, mais n'ont pas précisé les types cellulaires, soulignant la difficulté d'obtenir des souches précises pour chaque noyau. Cette approche est contre-productive, car la complexité excessive empêche d'obtenir des résultats pertinents. Comme mentionné dans le **chapitre 2.3.2.1**, un organe-sur-puce doit être simplifié pour répondre à des questions biologiques spécifiques. Les modèles bimodaux à trois compartiments, bien que simplistes, modélisent efficacement la directionnalité du cortico-striatal, mais ne reflètent pas l'organisation topographique des projections, encore absente dans la littérature.

### 3.2.1 Modélisation de pathologies affectant le système nerveux

L'utilisation des cerveaux-sur-puces pour modéliser des pathologies permet d'étudier des maladies du système nerveux en utilisant des cellules humaines, évitant ainsi la limite inter-espèces des modèles *in vivo*. En combinant le contrôle de la microarchitecture, des cellules humaines génétiquement pertinentes (portant des mutations ou prédispositions) et des facteurs environnementaux (exposition à des composés ou stress microenvironnemental), ces modèles représentent des plateformes adaptées à l'étude des maladies

neurodégénératives et neurodéveloppementales complexes. Ce chapitre détaillera les études utilisant ces technologies pour explorer ces neuropathologies.

#### *3.2.1.1 Maladies neurodégénératives*

##### Maladie d'Alzheimer sur puce

De nombreuses études ont utilisé des dispositifs microfluidiques et des cerveaux-sur-puces pour explorer divers aspects de la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Les dispositifs microfluidiques ont principalement été utilisés pour l'étude de la neuroinflammation liée à l'amyloïde béta (Aβ) et sa neurotoxicité (Annweiler et al. 2014; Deleglise et al. 2014) tandis que les cerveaux-sur-puces ont été utilisés pour l'étude de la propagation et l'agrégation de la protéine tau. Grâce à la séparation des corps cellulaires et des neurites, les cerveaux-sur-puces permettent de suivre précisément les taupathies, notamment en suivant le transfert des protéines tau entre les populations compartimentalisées par des exosomes et la communication synaptique (Wu et al. 2016; Calafate et al. 2015). L'étude de la toxicité de l'Aβ, en injectant un mélange de Aβ et de glutamate donc un compartiment synaptique, a permis de mieux comprendre son rôle dans l'hyperphophorylation (ajout aberrant de groupe de phosphate sur une protéine) des protéines tau, conduisant à la formation d'agrégats et la dégénérescence des axones. Un traitement pharmacologique avec de la menantine et vitamine D3 dans le compartiment contenant les corps cellulaires a réduit la dégénérescence axonale, soulignant l'importance du ciblage des traitements (Annweiler et al. 2014). Dans une étude récente, Lefebvre et al. ont utilisé le design tricompartiment du cerveau-sur-puce de Taylor, associé à des matrices de microélectrodes. À partir de cultures corticales primaires de souris, ils ont exposé les synapses formées dans la chambre synaptique à différents niveaux d'Aβ. Ils ont observé une diminution de la connectivité interchambres, sans altérer l'activité intrinsèque des compartiments présynaptique et postsynaptique. Ce modèle permet d'examiner les effets de l'Aβ sur la connectivité synaptique comme indicateur de la synaptotoxicité induite (Lefebvre et al. 2024)

Un système microfluidique bio-mimétique pour générer des gradients spatiaux, finement contrôlés par pompage, d'Aβ sur une culture primaire de neurones corticaux de rats pour étudier sa neurotoxicité (Choi et al. 2013). Ils ont observé que l'exposition à l'amyloïde bêta provoquait une atrophie neuronale, tandis que l'extension des neurites augmentait sous flux

continu. Ce système permet de réguler précisément le microenvironnement des cellules, facilitant l'étude des effets neurotoxiques de l' Aβ (Figure n°29 a). Une étude a utilisé des progéniteurs humains de la maladie d'Alzheimer pour modéliser la neuroinflammation via une triculture de neurones, astrocytes et microglies dans une puce 3D (Joseph Park et al. 2018). Cette puce, composée de deux chambres circulaires (une contenant des microglies entourant des neurones malades et des astrocytes), a montré la migration des microglies vers les neurones malades (figure n°29 b). Le modèle reproduit des caractéristiques clés de la maladie, comme l'agrégation des bêta-amyloïdes, l'accumulation de tau phosphorylé, et la neuroinflammation, offrant un outil précieux pour l'étude des interactions neurone-glie et la découverte de traitements. Enfin un modèle de barrière hématoencéphalique-sur-puce (composé d'un canal avec des cellules endothéliales et d'un autre canal avec des neurones malades séparés l'un de l'autre par une barrière) a été utilisé pour étudier l'accumulation d'Aβ et des protéines tau ainsi que leur transfert dans les cellules endothéliales (Figure n°29 c) (Shin et al. 2019). Cette puce a permis l'analyse en temps réel de la disruption de la barrière hématoencéphalique dans la maladie d'Alzheimer. Ce modèle reproduit plusieurs dysfonctionnements de la barrière hématoencéphalique-sur-puce observés chez les patients AD, tels que l'augmentation de la perméabilité, la baisse d'expression de protéines de jonction, et le dépôt d'amyloïde bêta (Aβ). Ce modèle fournit une plateforme utile pour étudier la BHE et tester de nouveaux médicaments capables de la traverser. Enfin, un dispositif microfluidique parallélisé avec cinquante puits pour la culture de neurosphéroides a montré que la perfusion en continu d'un milieu de culture contenant de l'Aβ exogène entraine la dégénérescence axonale et synaptique ainsi que la mort neuronale.

### Maladie de Parkinson sur puce

La majorité des études sur la maladie de Parkinson sur puce se concentre sur la pathogenèse de l'alpha-synucléine (α-syn). De nombreux modèles ont été développés, utilisant des dispositifs microfluidiques pour étudier la propagation, la diffusion de l'α-syn (Figure n°29 e) (João T. S. Fernandes et al. 2016) et sa toxicité (Figure n°29 f) (João Tiago S. Fernandes et al. 2014). Il est important de souligner que très peu d'études ont utilisé des cultures de neurones dopaminergiques. Une puce microfluidique à deux compartiments a été utilisée pour étudier la diffusion de l'α-syn et sa captation par les neurones. Dans ce dispositif, deux populations (une population contrôle et une produisant de l'α-syn fusionnée à la GFP)

sont reliées par des microcanaux. L'étude a révélé la diffusion de l'α-syn dans les microcanaux ainsi que son absorption par les neurones naïfs (Figure n°29 e). En utilisant une puce commerciale de Mimetas permettant une culture compartimentée en 3D, *Bolognin et al*. (Bolognin et al. 2019) ont étudié les effets de la mutation LRRK2-G2019S sur des cellules souches induites, une forme génétique de la maladie de Parkinson non liée à l' α-syn, qui augmente l'activité de la kinase LRRK2, provoquant la phosphorylation excessive de certaines protéines, contribuant ainsi à la dégénérescence neuronale observée dans la maladie de Parkinson. Les neurones dans la puce se sont développés et ont établi un réseau pendant 6 semaines avant de présenter une différenciation dopaminergique réduite, une morphologie mitochondriale altérée, et une augmentation de la mort cellulaire. Le traitement avec un inhibiteur de LRRK2 (Inh2) a corrigé ces phénotypes. De plus, l'étude montre que le fond génétique des patients influence davantage ces phénotypes que la mutation elle-même. Cette étude met en avant l'importance des cerveaux-sur-puces multiplexés associés à des algorithmes d'imagerie pour permettre des analyses pharmacophénomiques robustes dans des conditions pathologiques. (Figure n°29 g).

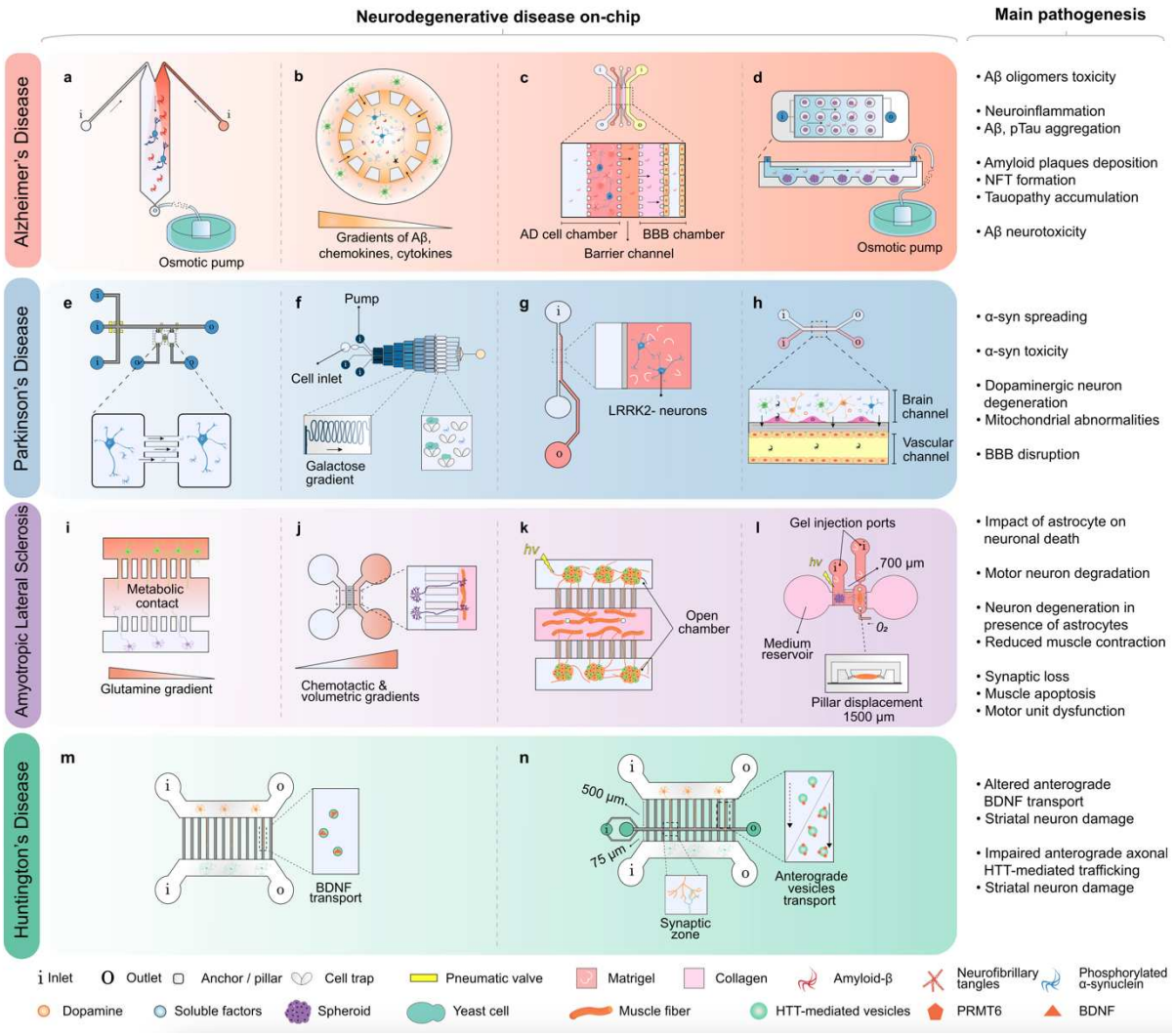



*Figure 29 Exemple de cerveau-sur-puce pour la modélisation de maladies neurodégénératives. Puces 2D, 3D et barrière hémato-encéphalique pour l'étude de différentes conditions pathologiques de la maladie d'Alzheimer (a-d). Puces de diffusion, cerveau-sur-puce et barrière hémato-encéphalique pour l'investigation de la maladie de Parkinson (e-h). Neurones moteur-sur-puce pour l'étude de la sclérose latérale amyotrophique (i-l) . Cerveau-sur-puce pour l'étude de la maladie de Huntington (m, n). Tiré de Amartumur et al., 2024 (Amartumur et al. 2024).*

### La sclérose latérale amyotrophique sur puce

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative progressive caractérisée par la dégénérescence des motoneurones dans le cortex moteur, le tronc cérébral et la moelle épinière, entraînant atrophie musculaire, faiblesse et paralysie progressive. Les mécanismes de cette maladie restent mal compris. La SLA existe sous forme héréditaire familiale ou idiopathique, impliquant plusieurs mutations génétiques. De nombreux mécanismes conduisent à la mort des motoneurones, mais il n'existe pas de modèle unifié, malgré des modèles *in vivo* présentant des mutations génétiques familiales

(Todd et Petrucelli 2022). Le développement de modèles *in vitro* spécifiques aux patients est donc nécessaire.

La neuroinflammation est une caractéristique de la SLA. Une étude utilisant un cerveau-sur-puce a étudié l'impact d'astrocytes porteurs de mutations dans le gène SOD1 (caractéristique de la SLA), qui passent d'un rôle de soutien à un rôle neurotoxique, sur des neurones corticaux. Ce modèle de cerveau-sur-puce comportait trois compartiments séparés par des microcanaux, avec des astrocytes et des neurones corticaux dans des compartiments distincts, reliés par un troisième compartiment où se créent des contacts métaboliques permettant d'étudier de manière précise l'interaction des astrocytes sur les contacts métaboliques. Un gradient de glutamate était établi entre les compartiments pour créer un stress glutamatergique qui a entrainé une réduction de la densité neuronale et une diminution de l'expression de synapsine (Figure n°29 i) (Kunze et al. 2013). Ainsi cette étude a souligné le rôle clé des astrocytes portant la mutation SOD1 dans la neurotoxicité associée à la SLA.

La SLA affectant également les motoneurones dans le tronc cérébral, la moelle épinière et les jonctions neuromusculaires, plusieurs modèles de « nerfs-sur-puce » ont été développés (Figure n°29 j,k,l) (Stoklund Dittlau et al. 2021; Machado et al. 2019; Osaki, Uzel, et Kamm 2018). Toutefois, ce travail de thèse étant axé sur le système nerveux central, ces modèles périphériques ne seront pas détaillés ici.

### Maladie de Huntington sur puce

Les cerveaux-sur-puces développés pour l'étude de la maladie de Huntington répliquent de manière simplifiée le réseau cortico-striatal en incluant des cellules corticales glutamatergiques qui projettent sur des neurones striataux majoritairement GABAergiques. Ces puces se composent de deux ou trois compartiments. Les études se concentrent principalement sur deux aspects de la maladie d'Huntington : l'étude de la toxicité de la forme mutée de la protéine huntingtine (mHTT) et les dysfonctionnements et l'atrophie du réseau cortico-striatal. Une étude a utilisé des cultures primaires de neurones corticaux et striataux de souris exprimant la mutation du gène HTT pour analyser, via un cerveau-sur-puce, la réduction du transport de BDNF. Elle a également évalué l'effet bénéfique du complexe chaperon TCP-1, qui aide au repliement des protéines, sur la diminution des agrégats de mHTT dans les neurones (Figure n°29 m) (X. Zhao et al. 2016). L'étude a montré que l'association de

neurones corticaux naïfs avec des neurones striataux mutants réduit les effets pathologiques, grâce à la libération de BDNF par les neurones corticaux. Selon la même approche, en utilisant un cerveau-sur-puce à trois compartiments, *Virlogeux et al* (Virlogeux et al. 2018) ont cultivé des neurones primaires de souris portant la mutation du gène HTT pour quantifier les déficits réseau, au niveau structurel (branches axonales, formation des synapses) et fonctionnel (transport intracellulaire de BDNF et de mitochondrie, transmission glutamatergique, activité calcique). Les auteurs montrent que la flexibilité des puces permet de créer des réseaux neuronaux hybrides, révélant le rôle critique du cortex dans les dysfonctionnements du réseau dans la maladie de Huntington. En connectant des neurones corticaux sains à des neurones striataux malades, ils ont découvert que traiter le cortex dès les premiers stades pourrait ralentir la dégénérescence du striatum. Contrairement à l'idée que la maladie de Huntington affecte principalement le striatum, cette étude suggère que le cortex joue un rôle central dans la progression de la maladie.

Utilisant la même puce, une autre étude a étudié le transport axonal antérograde de vésicule ainsi que l'effet positif de PRMT6 (une enzyme qui effectue des méthylations et qui pourrait affecter les moteurs vésiculaires). Les auteurs ont montré qu'une augmentation de l'expression de PRMT6 via un lentivirus dans les cultures primaires cortico-striatal murines Huntington améliore le transport axonal, réduit la mort neuronale et corrige les défauts causés par la huntingtine mutante (HTT). Ainsi PRMT6 pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique potentielle pour les défauts de transport axonal de la maladie d'Huntington. Enfin, *Virlogeux et al* (Virlogeux et al. 2021) ont examiné l'importance de la palmitoylation, un processus de modification post-traductionnelle des protéines par l'ajout de groupements lipidiques, dans le cadre de la maladie de Huntington. Cette modification est essentielle pour le transport des vésicules axonales, notamment celles contenant le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Les auteurs ont découvert que la palmitoylation est réduite chez les souris portant la maladie d'Huntington. Pour contrer cet effet, ils ont utilisé un inhibiteur de l'enzyme APT1 (responsable de processus de dépalmitoylation), appelé ML348 (injecté par voie intrapéritonéale), afin d'augmenter la palmitoylation cérébrale. Ce traitement a permis de restaurer le transport du BDNF, d'améliorer la fonction synaptique et de réduire la neuropathologie et les déficits comportementaux chez les souris. En utilisant également des neurones corticaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) de patients atteints de la maladie de Huntington, l'étude a montré que le traitement par ML348 (injecté

dans tous les compartiments) augmentait le transport du BDNF et améliorait la communication neuronale dans des modèles cellulaires humains, suggérant un potentiel thérapeutique pour les patients. Ainsi, l'inhibition d'APT1 et l'augmentation de la palmitoylation pourraient représenter une stratégie thérapeutique pour la maladie de Huntington.

## 3.3 Conclusion

Les cerveaux-sur-puces sont donc des modèles complémentaires intéressants qui peuvent permettre la construction de réseaux neuronaux complexes de manière minimaliste afin d'effecteur des études mécanistiques dans des contextes sains ou pathologiques. En effet, la compartimentation des cellules qui communiquent entre elles via leurs projections axonales dans les microcanaux permet un contrôle fonctionnel des différentes populations. Ainsi, les cerveaux-sur-puces ont été utilisés pour la modélisation de nombreuses maladies neurodégénératives et sont de plus en plus étudiés dans des contextes de maladies neurodéveloppementales (Cerutti et Brofiga 2024). Compte tenu de leur rôle important dans une vaste gamme de fonctions cérébrales et de leur implication dans de nombreuses neuropathologies, la reproduction du réseau cortico-striatal sur puce représente une opportunité clé pour l'investigation de nouveaux mécanismes cellulaires. Néanmoins, à ce jour, la littérature aborde peu la reproduction de ce réseau et ne parvient pas à reproduire ses principales caractéristiques, telles que l'unidirectionnalité des projections corticales et leur invasion topographique du striatum. Ainsi, il apparaît essentiel de développer de nouveaux modèles de réseaux corticostriataux sur puce pour offrir un nouvel outil dans l'investigation des mécanismes neuropathologiques.

# 4 Objectif de la Thèse

La formation, la modification et les perturbations de l'étonnante complexité topographique et fonctionnelle des réseaux neuronaux revêtent une importance capitale dans l'ensemble des fonctions cérébrales. Les mécanismes de leur mise en place, de leur maturation et de leurs perturbations dans des contextes sains ou pathologiques s'établissent sur un large spectre spatiotemporel, allant de la plasticité synaptique dynamique au recâblage d'un réseau à l'échelle macroscopique. Malgré de nombreuses observations et études sur les réseaux neuronaux, leurs mécanismes cellulaires sous-jacents sont encore peu connus ou compris. Depuis un peu plus de 30 ans, la rencontre de la microfabrication, de la microfluidique et de la biologie cellulaire a permis la naissance de la technologie des organes-sur-puces, qui sont des dispositifs microfluidiques *in vitro* permettant une reproduction de microarchitectures cellulaires proches de la physiologie, un contrôle précis du microenvironnement, la modélisation de pathologies complexes. Ainsi, de nombreux modèles de cerveaux-sur-puces ont été développés, permettant la reproduction de réseaux neuronaux d'intérêt et leur manipulation. Un grand nombre d'études se sont intéressées à la croissance axonale et à l'établissement d'un réseau neuronal fonctionnel, ainsi qu'à l'utilisation de ces nouveaux dispositifs pour les maladies neurodégénératives. Néanmoins, à ce jour, aucun modèle de cerveau-sur-puce n'a été développé pour étudier l'établissement topographique d'un réseau neuronal et la perturbation de cette topographie dans des contextes neuropathologiques. **L'objectif de mon travail de thèse a été de développer un cerveau-sur-puce capable de reproduire la topographie physiologique d'un réseau neuronal afin de le manipuler et étudier l'organisation topographique des projections, simulant un contexte pathologique neurodéveloppemental**. Pour ce faire, nous avons développé un dispositif cerveau-sur-puce à trois compartiments modélisant simplement la topographie du réseau cortico-striatal, où deux populations corticales projettent sur le striatum central, dans des zones topographiquement distinctes, permettant une manipulation et une étude simplifiée de la modification de cette topographie. Le développement, la caractérisation et la manipulation de la topographie du réseau reconstruit sur puce font l'objet d'une première publication (Poinsot et al. 2024).

**Dans un second temps, nous avons intégré cette puce à une plateforme multiplexée et automatisée dans le but de simplifier la manipulation et améliorer la reproductibilité des résultats. Pour ce faire, nous avons développé une machine de distribution microfluidique adaptée à la géométrie et aux contraintes des organes-sur-puces**. Le développement de cette machine, en partenariat avec l'entreprise Fluigent, et la caractérisation d'un premier prototype fonctionnel font l'objet d'une deuxième étude pour laquelle une demande de brevet a été déposée en novembre 2023 et qui est en préparation pour publication.

# 5 Étude 1 : Introduction

Dans cette étude, nous avons exploré la réorganisation topographique des réseaux neuronaux hyperexcitables, un phénomène central dans de nombreux troubles neurodéveloppementaux et psychiatriques. Les circuits corticostrataux, qui jouent un rôle clé dans l'intégration et le traitement des informations au sein des ganglions de la base, sont particulièrement vulnérables aux altérations de la connectivité causées par des perturbations génétiques ou environnementales. Ces circuits, organisés de manière hiérarchique et précise, sont essentiels à des fonctions cognitives et émotionnelles complexes. Toutefois, leur étude *in vivo* représente un défi majeur en raison de leur complexité structurelle et de la difficulté d'intervenir directement sur ces systèmes au cours de leur développement précoce.

Pour surmonter ces limitations, nous avons développé, en partenariat avec Benoit Charlot de l'Institut d'électronique des systèmes (Université de Montpellier, UMR 5214), un modèle expérimental basé sur une plateforme microfluidique de type cerveau-sur-puce, qui nous permet de recréer des circuits corticostrataux organisés de manière topographique dans des conditions contrôlées *in vitro*. Cette approche innovante utilise des microcanaux inspirés des valves de Tesla pour diriger les projections axonales de manière unidirectionnelle. De plus, nous avons reproduit l'organisation topographique des projections en modulant la taille du compartiment striatal, ce qui nous a permis de séparer les projections du cortex sur des zones spécifiques du striatum et de créer une zone exempte de projections corticales. Ce dispositif nous a offert une résolution spatiale et temporelle sans précédent pour analyser les dynamiques de formation et de réorganisation des réseaux neuronaux sous l'effet de perturbations génétiques.

Notre modèle nous a permis d'étudier l'impact de mutations génétiques affectant l'excitabilité neuronale sur la topologie des circuits cortico-striataux. Nous avons observé que l'hyperexcitabilité neuronale induite par ces mutations entraîne une reconfiguration sélective des réseaux cortico-striataux, avec la formation de nouveaux nœuds de convergence. Ces nœuds anormaux réorganisent non seulement la connectivité locale, mais perturbent

également les connexions à longue distance, modifiant ainsi l'architecture fonctionnelle globale des réseaux.

Ce travail s'inscrit dans une démarche visant à comprendre comment les déséquilibres électrophysiologiques, survenant dès les premières étapes du développement, peuvent altérer durablement la connectivité cérébrale et être liés à des pathologies spécifiques des circuits neuronaux, telles que l'autisme, l'épilepsie ou la schizophrénie. En recréant un environnement cérébral biologiquement pertinent dans un cadre expérimental contrôlé, nous avons pu manipuler et observer avec précision l'évolution de ces réseaux, en identifiant les points critiques de leur réorganisation. Notre approche, qui combine des analyses morphologiques et fonctionnelles, ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude des pathologies liées aux circuits cérébraux et pourrait contribuer au développement de stratégies thérapeutiques plus ciblées.

# Biologically grounded brain-on-chip model identifies selective topographic reorganization within hyperexcitable neural networks.

Maxime Poinsot[1], Marine Dos Santos[1], Baptiste Marthy[1,2], Ana Borges-Correia[1], Eduardo Gascon-Gonzalo[1], Benoit Charlot[3], and Maxime Cazorla[1,*]

[1]Institut de Neurosciences de la Timone, Aix Marseille Université, CNRS, UMR7289, Marseille, France.
[2]Institut Fresnel, Aix Marseille Université, Centrale Marseille, CNRS, UMR7249, Marseille, France.
[3]Institut d'Electronique et des Systèmes, Université Montpellier, CNRS, UMR5214, Montpellier, France
*To whom correspondence should be addressed: maxime.cazorla@inserm.fr

## Abstract

Connectomics has revolutionized our understanding of brain function by emphasizing the importance of neural networks and their topographical organization. Corticostriatal circuits, which play a critical role in cognition and emotion, follow a precise topographic architecture essential for integrating and processing cortical information within the basal ganglia. Disruptions to this connectivity are often implicated in neurodevelopmental and psychiatric disorders such as OCD, schizophrenia, epilepsy, and ASD. However, studying network disruptions *in vivo* presents significant challenges due to their intricate architecture and early developmental onset. To address this, we employed a brain-on-chip microfluidic platform to recreate a biologically relevant model of topographically organized corticostriatal networks. By mimicking the directional control of neuronal projections using Tesla valve-inspired microchannels, we demonstrate that genetic perturbations affecting neuronal excitability during development lead to selective alterations of local versus long-range network topology, resulting in the formation of new convergent nodes. This model offers critical insights into how early perturbations contribute to circuit-specific pathologies, providing a valuable tool for understanding neurodevelopmental disorders and advancing therapeutic strategies.

## Introduction

Connectomics, the study of brain connections, has driven breakthrough mapping initiatives such as the Human Connectome Project, the BRAIN Initiative, and the Blue Brain Project (Nowinski, 2017). Given its crucial role in high-order functions, cognition and emotion, the cerebral cortex has been a main focus of connectome research. Each cortical area sends descending projections that innervate subcortical structures, including the striatum, the primary input of to the basal ganglia. Corticostriatal projections are hierarchically organized and serially ordered, following a complex and precise topographic architecture, known to be instrumental in the transduction, integration, and processing of cortical information within the basal ganglia (Alexander et al., 1986; Parent and Hazrati, 1995; Graybiel, 2008). Anatomical studies across various species, including primates and rodents, have consistently demonstrated the presence of topographically organized corticostriatal pathways, highlighting integrative zones of convergence at the border of specific projection territory (Flaherty and Graybiel, 1991; Berendse et al., 1992; Hoffer and Alloway, 2001; Mailly et al., 2013; Averbeck et al., 2014; Hintiryan et al., 2016). According to the prevailing model, cortical output projections are functionally segregated into parallel cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loops, each dedicated to the transmission and integration of specific types of information (sensorimotor, associative, or limbic) (Alexander et al., 1986; Haber, 2003; Oh et al., 2014).

The organizational principle of corticostriatal pathways has been instrumental in elucidating the pathophysiology of various neural disorders.

Alterations in brain connectivity are often associated with disastrous cognitive and behavioral consequences in a wide array of neurodevelopmental and psychiatric diseases (Bullmore and Sporns, 2009; Crossley et al., 2014), including obsessive compulsive disorder (OCD) (Milad and Rauch, 2012; Ahmari et al., 2013), schizophrenia (Bullmore et al., 1997; Liu et al., 2008), epilepsy (Royer et al., 2022), and autism spectrum disorder (ASD) (Zeng et al., 2017). These dramatic neurological disorders, characterized by disrupted connectivity and activity in specific brain regions, often find their pathological origin during neurodevelopment (Shepherd, 2013; Nelson and Kreitzer, 2014). The formation and refinement of neural circuits typically occurs in-utero and during post-natal life, making early brain development a critical and vulnerable period for the establishment of brain networks. Genetic or external factors altering electrophysiological properties of neurons can affect axonal growth and synaptic connectivity, creating an excitation/inhibition imbalance in corticostriatal networks, linked with increased probability for neurodevelopmental disorders (Wolfram and Baines, 2013). For instance, genetic mutations in the inwardly rectifying potassium Kir2.1 channel gene altering neuronal excitability has been linked with dysfunctional cortical networks and is associated with a genetic risk for bipolar disorders, schizophrenia, mental retardation, epilepsy, and ASD (Sicca et al., 2011; Imbrici et al., 2013; Ambrosini et al., 2014; Binda et al., 2018). Therefore, understanding the neurodevelopmental origins of brain circuit topology in the healthy and diseased brain is essential, yet remains a significant challenge.

Recent progress in microfluidics and organ-on-chip technology has made it possible to develop unique platforms for creating *in vitro* models that approximate the complex environment of the brain (van der Meer and van den Berg, 2012; Neto et al., 2016). Brain-on-chip are state-of-the-art microfluidic devices used for a minimalistic reconstruction of neural circuits, in health and disease. Freedom offered by the design allows the creation of complex neuronal networks, using co-cultures and proper directional control of neuronal connections (Peyrin et al., 2011; Hasan and Berdichevsky, 2016; Honegger et al., 2016; Renault et al., 2016; Dauth et al., 2017; Gladkov et al., 2017; Holloway et al., 2019). Compartmentalization of neuronal cells and their neurites further allows independent control of each actor of the network (Taylor et al., 2005; Taylor et al., 2010; Moutaux et al., 2018a; Moutaux et al., 2018b; Virlogeux et al., 2018). Moreover, these microsystems offer unprecedented spatiotemporal resolution, enabling investigations of cellular and molecular mechanisms with high precision for the study of brain disorders and drug screening or pharmacological assays (Taylor et al., 2005; Yi et al., 2015; Nikolakopoulou et al., 2020; Holloway et al., 2021; Virlogeux et al., 2021; Miny et al., 2022).

Here we used a brain-on-chip microfluidic strategy to reconstitute a biologically grounded model of topographically organized corticostriatal circuits. We recapitulated the specific orientation of corticostriatal projections using Tesla valve-inspired asymmetric microchannels. By integrating morphological and functional analytic tools, we show that genetic perturbation of neuronal excitability during development profoundly destabilizes the topology of corticostriatal networks, creating new convergent nodes. This platform highlights how early developmental perturbations selectively affect the local and long-range architectural organization of the brain wiring diagram, offering new insights into circuitry-specific connectopathies.

## Results

### Topographic reconstruction of cortico-striatal pathways using microfluidic-based devices

We reconstructed the topographic organization of two segregated corticostriatal networks *in vitro* using a silicon polymer-based microfluidic device (**Figure 1a)**. We designed the microdevice using the open-access comprehensive corticostriatal projectome map developed by Hintiryan and colleagues (Hintiryan et al., 2016). This design emulates the architectural configuration of somatic sensorimotor and medial prefrontal cortical areas, which project to the ventrolateral and dorsomedial regions of the striatum, respectively (**Figure 1a)**. We selected these corticostriatal subnetworks due to the clear segregation of their terminal fields within the striatum and their specialized roles in processing.

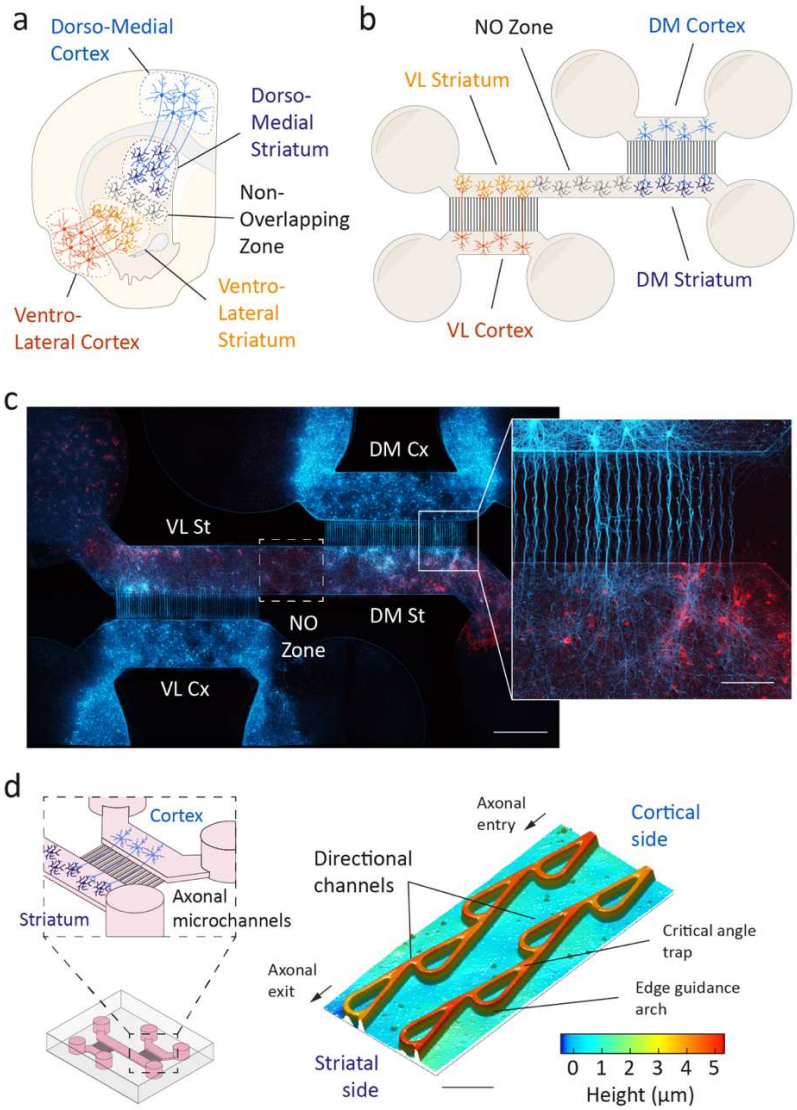



**Figure 1. Biologically grounded model for the reconstruction of topographically segregated corticostriatal networks. (a)** Schematic representation of dorsomedial and ventrolateral cortex regions (DM Cx, VL Cx) topographically projecting onto their respective striatal subregions (DM St, VL St) and separated by a non-overlapping (NO) zone. **(b)** Schematic of the 3-compartment microfluidic device allowing fluidic isolation of cortical and striatal chambers that are connected via unidirectional microchannels. An intermediate space devoid of cortical projections is inserted between both sets of microchannels in the striatal chamber to replicate the non-overlapping zone. Cylinders represent accessible wells for seeding neurons and perfusing liquids. **(c)** Mosaic reconstruction showing GFP-expressing cortical neurons (cyan) projecting through unidirectional microchannels onto mCherry-expressing striatal neurons. A non-overlapping (NO) zone devoid of cortical inputs is created between the two direct-projection fields (shown in inset). Scale bar, 1000 µm (Inset, 200 µm). **(d)** Tesla valve geometry was used to create unidirectional microchannels between cortical and striatal compartments. Phase contrast image of Tesla valve microchannel segment showing the critical angle and edge guidance constraints. Microchannel dimensions and geometries are color-coded. Scale bar, 30 µm.

and transferring sensory and executive information, respectively (Alexander et al., 1986).

Additionally, the organization of these circuits is significantly altered in mouse models of disconnection syndromes, such as the zQ175 model of Huntington's disease and the monoamine oxidase (MAO) A/B knockout model of autism-like behaviors (Hintiryan et al., 2016), making these two opposing pathways an ideal model for studying topographical rearrangement *in vitro*. The chip was configured to establish two parallel, opposing cortical chambers that project

unidirectionally toward their respective striatal target areas, arbitrarily referred to here as dorsomedial (DM) and ventrolateral (VL) corticostriatal networks (**Figure 1b**).

This arrangement also creates a central non-overlapping (NO) zone, where striatal neurons remain isolated from cortical axonal projections (**Figure 1b,c**). Each cortical chamber was seeded with a pool of rat primary cortical neurons, while the central postsynaptic target chamber was uniformly populated with striatal neurons (**Figure 1c**). The neuronal compartments are fluidically isolated and interconnected exclusively through a series of 500 µm-long microchannels. Given that cortical dendrites have a maximum growth length of approximately 450 µm (Taylor et al., 2005; Virlogeux et al., 2018), only axons from cortical neurons were allowed to extend through the microchannels into the striatal compartment. We further adapted the dimensions of the microchannels to optimize fluidic isolation and to reduce the number of axons in each channel, by reducing their width and height to 3 µm and 4 µm respectively (**Figure 1d**).

### Tesla valve-inspired microchannels provide fluidic and axonal directionality

The primary challenge in conceiving physiologically-relevant models of segregated pathways is to control the unidirectionality of cortical axons projecting toward the striatal population, while preventing aberrant retrograde striato-cortical connections. To achieve this, we designed microchannels following the original geometry of valvular conduits proposed by Nikola Tesla in 1920 (Tesla, 1920) (**Figure 1d**). The unique architecture of the Tesla valve confers a key dual functionality advantage, including a robust diode effect for fluidic movement in channels and the controllable feedforward propagation of axonal transmission in *in vitro* systems (Nguyen et al., 2021; Purwidyantri and Prabowo, 2023; Winter-Hjelm et al., 2023; Winter-Hjelm et al., 2024). A stable, positive fluidic diode effect predicts facilitated nutrient support and growth of cortical projections toward the striatal target, while preventing retro-projections from striatal axons. In addition, the Tesla valve integrates two elegant geometric mechanisms to trap and re-route axons, known as the critical angle (Arrow) effect and the edge guidance effect (Arch), respectively (Renault et al., 2016) (**Figure 1d**). Interestingly, these two mechanisms have been independently proven to facilitate axonal directionality by trapping (Holloway et al., 2019) or re-routing growing neurites (Renault et al., 2016). We therefore reasoned that incorporating fluidic diodicity alongside two geometric constraints, utilizing Tesla valve-shaped microchannels, would ensure the formation of oriented, target-specific corticostriatal projections.

We first investigated whether the Tesla Valve design offers a significant advantage over Arrow and Arch geometries to reconstruct oriented neuronal networks *in vitro*. We produced microdevices with the three designs (Tesla valve, Arrow, Arch; **Figure 2a**) and characterized their fluidic diodicity by tracking the flow of nanobeads within the microchannels after applying various volume differentials (ΔV) between the emitting and receiving chambers (**Figure 2b**). We termed Forward (Fwd) the direct polarization of the fluidic diode (*i.e.*, nanobeads flow from Emitting-to-Receiving chamber); by opposition, we termed Reverse (Rev) the indirect polarization of the diode (*i.e.,* Receiving-to-Emitting). We estimated the diodic effect by calculating the Net velocity of nanobeads (Δv) (see Materials and methods). The Tesla valve configuration showed a stable and positive diodic effect across all ΔV values ($F_{1,84}$=55.33; $p$<0.0001; n=8 microchambers with approximatively 300 moving nanobeads; **Figure 2b,c**). This effect was evident even for the smallest ΔV values, indicating robust performance across all tested volume variations, with mean velocities ranging from +8±2 to +18±2 µm/s. We next compared the fluidic performance of the Tesla valve design with Arrow (critical angle only) and Arch (edge guidance only) geometries. While Arrow microchannels demonstrated an overall positive diode effect, the flow of nanobeads was relatively low, appearing only at high ΔV values (above 15 µL) and remaining inconsistent across higher volumes (**Figure 2b,c**). Fluidic polarization of the Arch design was also inconsistent across ΔV (**Figure 2b,c**). At low ΔV (below 25µL), the flow was even opposite to the expected fluidic diode effect for this configuration, with a maximum velocity reaching -11±1 µm/s at the lowest ΔV (design effect : $F_{2,30}$=27.4, $p$<0.0001; design x

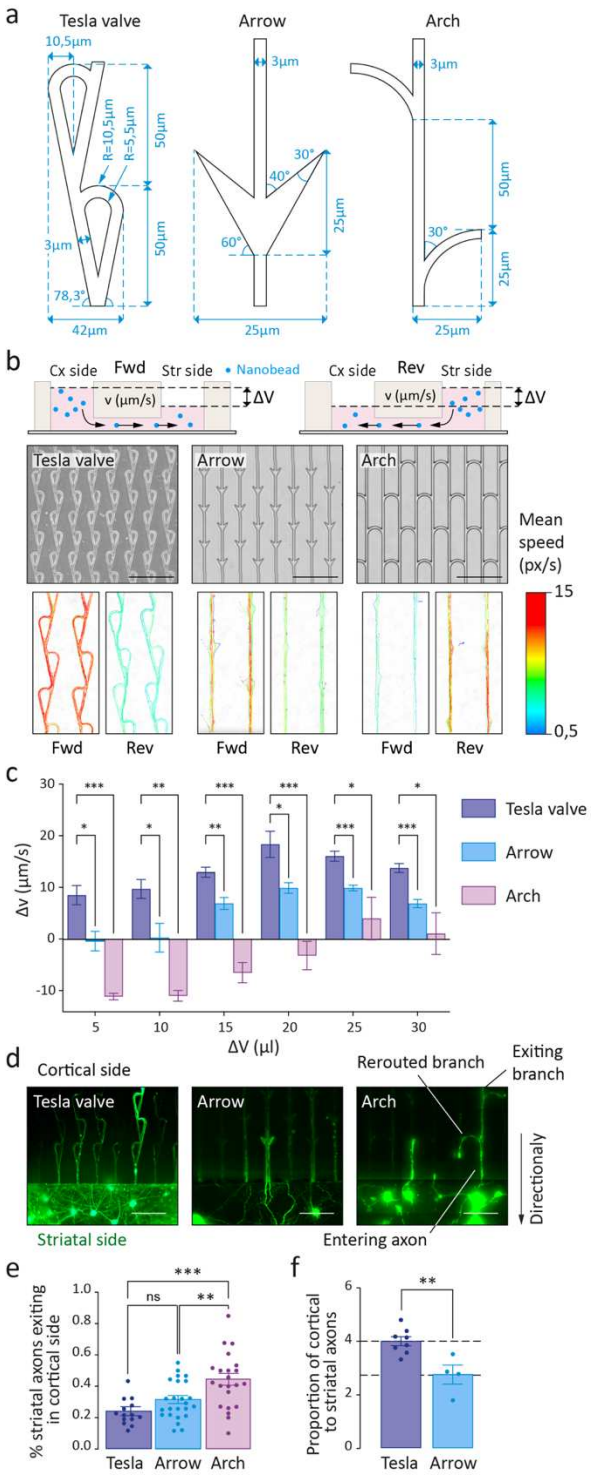



**Figure 2. Fluidic and axonal diodicity of Tesla valve, Arrow and Arch geometric designs. (a)** Schematic of the three geometric designs with dimensional parameters (blue). **(b)** Fluidic diodicity of the three designs using nanobeads flow. ΔV represents the volume differences between cortical and striatal chambers and v the net velocity of nanobeads through microchannels. A Forward (Fwd) flow corresponds to a movement of nanobeads from cortical to striatal chamber. A Reverse (Rev) flow corresponds to the opposite movement. Photomicrographs of the three microchannel designs and their respective contrast phase images showing nanobeads color-coded mean velocity. Scale bar, 150 µm. **(c)** Fluidic diodicity is calculated as the median velocity of nanobeads moving in the forward direction subtracted by the median velocity of nanobeads moving in the opposite reverse direction. A positive value indicates a preferential forward flow for a given ΔV, while a negative value indicates reverse flow (design effect : $F_{2,30}$=27.4, $p$<0.0001; n=8 microchambers; *$p$<0.05, **$p$<0.01, ***$p$<0.001). **(d)** GFP-expressing striatal axons back-projecting into the three microchannel designs. Scale bar, 100 µm. **(e)** Proportion of back-projecting GFP-expressing striatal axons toward the cortical chamber (design effect : $F_{2,57}$=9.8, $p$=0.0002; n=20 microchambers; **$p$<0.01, ***$p$<0.001; ns, non-significant). **(f)** Proportion of cortical to striatal axons defining global axonal diodicity ($t$-test, **$p$<0.01; n=6 microchambers).

volume interaction: $F_{10,110}$=1.9, $p$<0.05; n=8 microchambers).

We next examined the axonal diodicity potential of the Tesla valve design by evaluating the proportion of cortical axons exiting into the striatal chamber compared with the proportion of striatal axons extending back in the opposite direction (**Figure 2d**). To do so, we expressed the fluorescent protein GFP in either cortical or striatal neurons and reported the number of axons entering and exiting each microchannel, in a fully established and mature network (18 days *in*

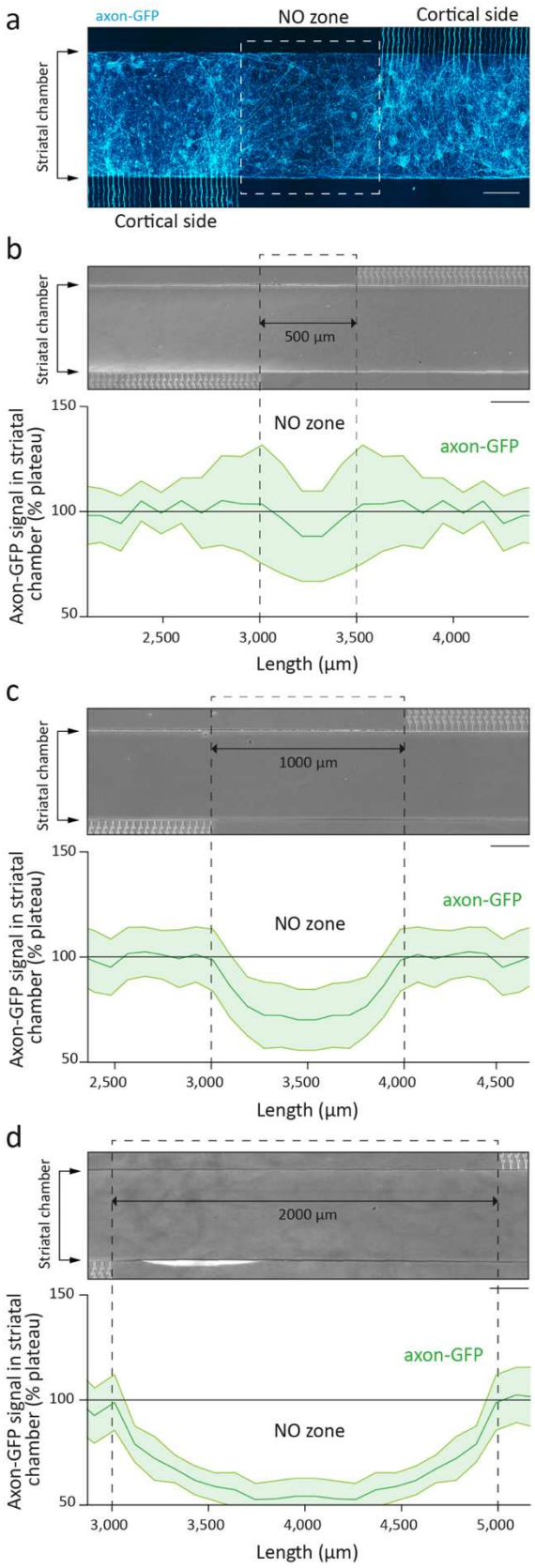



**Figure 3. Structural segregation of cortical projections in the striatal chamber. (a)** GFP-expressing cortical axons (cyan) massively project into the striatal subregion directly facing microchannels. A non-overlapping (NO) zone devoid of cortical projections is created by varying the length of the intermediate zone between microchannels. Scale bar, 250 µm. **(b-d)** Photomicrographs of striatal chambers with varying intermediate NO zone length (**b**, 500 µm; **c**, 1000 µm; **d,** 2000 µm). The efficiency of structural segregation was assessed by plotting fluorescence profiles of GFP-labeled cortical axons centered on the non-overlapping zone for each length. Fluorescence values were normalized to the mean fluorescence in the direct projection zone (n=4 microchambers). Scale bar, 200 µm.

*vitro* (DIV18)) (Moutaux et al., 2018b). We found that the Tesla valve design effectively minimized aberrant striatum-to-cortex axonal projections, achieving a 1:5 ratio (1 striatal axon exiting into the cortical chamber for every for 5 axons entering the microchannel; n=14 microfluidic chips from 4 distinct cultures; **Figure 2e**). In contrast, Arrow and Arch geometries only limited the backward growth of striatal axons to a 1:3 and 1:2 ratio, respectively (n=22-24 microfluidic chips from 4 distinct cultures; **Figure 2e**).

We further compared the number of cortical and striatal axons reaching the opposite chamber for each channel design (**Figure 2f**). We found that the Tesla valve facilitates the passage of four times more cortical axons compared to striatal axons through the microchannels. In contrast, Arrow microchannels demonstrated significantly lower efficiency, being only half as effective as the Tesla valve geometry in promoting cortical axon passage ($p< 0.01$; unpaired t-test; n=4-8 microchips from 3 cultures; **Figure 2f**). Our findings demonstrate the efficiency of the Tesla valve in maintaining the intended directional connectivity. This design ensures a reliable diode effect, regardless of volume variations, and features a unidirectional geometric configuration that effectively traps most striatal backward projections while favoring the growth of feedforward cortical axons.

## Structural and functional segregation of cortical terminal fields in the striatal chamber

We next investigated the minimum distance required between the two cortical emitting chambers to guarantee distinct separation of their terminal fields in the striatum. In this configuration, a central non-overlapping region where striatal neurons do not receive axonal projections from either cortical compartment should be maintained. This spacing is essential in the brain for preserving distinct functional zones within the striatum and avoiding interference between neighboring pathways (Averbeck et al., 2014; Oh et al., 2014).We estimated the minimum distance between adjacent non overlapping corticostriatal terminal fields to be at least 500 µm, based on previous tracing studies of the rodent corticostriatal system (Mailly et al., 2013; Oh et al., 2014). We therefore designed three devices with non-overlapping zones of 500, 1000 and 2000 µm in length (**Figure 3**). We infected cortical neurons with a lentivirus expressing GFP and quantified axonal fluorescence in the striatal chamber at DIV 18 when the network is already stable and functionally mature [19] (**Figure 3a**). In the 500 µm layout, cortical axons exhibited extensive invasion into the striatal chamber, occasionally extending across to the contralateral corticostriatal terminal field. This pervasive axonal spread resulted in the complete loss of the non-overlapping zone between the two regions. (**Figure 3b**). In contrast, both 1000 µm and 2000 µm configurations efficiently created a zone devoid of axonal projections, as shown by the sudden drop of fluorescence measured in this region (**Figure 3c,d**). Interestingly, the well-defined boundaries of the fluorescent signal indicate that cortical axons do not extend significantly beyond their direct cluster zone and are maintained within a topographically-restricted organization.

The apparent structural regionalization of the two corticostriatal does not inherently imply functional segregation regarding information transmission and integration. To verify this, we infected striatal neurons with a lentivirus expressing GcaMP6f, a fast, genetically-encoded calcium sensor that monitors neuronal activity (Chen et al., 2013). In culture, striatal neurons predominantly exhibit inhibitory characteristics, showing transient GCaMP6f fluorescence rises only in response to excitatory inputs from cortical neurons establishing functional synaptic connections (Moutaux et al., 2018a; Moutaux et al., 2018b). We took advantage of the fluidic isolation of the microchamber to selectively inhibit neuronal activity of projecting cortical neurons with tetrodotoxin (TTX, a sodium channel blocker) while assessing network activity in the corresponding striatal target region. Calcium imaging was performed in the ventrolateral terminal field region of the striatal chamber (VL St) following selective inhibition of cortical activity, first in the corresponding ventrolateral cortical region (VL Cx) and then in the opposing dorsomedial cortical region (DM Cx) (**Figure 4a,b**). Since VL St neurons primarily receive projections from VL Cx, we reasoned that any residual activity observed after VL Cx inhibition would result from indirect axonal projections from DM Cx (**Figure 4b**). In basal condition, we found that 80±10% of

striatal cells displayed GCaMP6f activity in the recorded sub striatal field (500 µm, 79±7%, n=6; 1000 µm, 82±4%, n=16; 2000 µm, 68±2%, n=7), with a mean of 3.5±0.5 events per min per cells for all designs (500 µm, 3.3±0.1%; 1000 µm, 4.1±0.9%; 2000 µm, 3.2±0.1%; **Figure 4c-e**). In the 500 µm configuration, inhibiting the direct

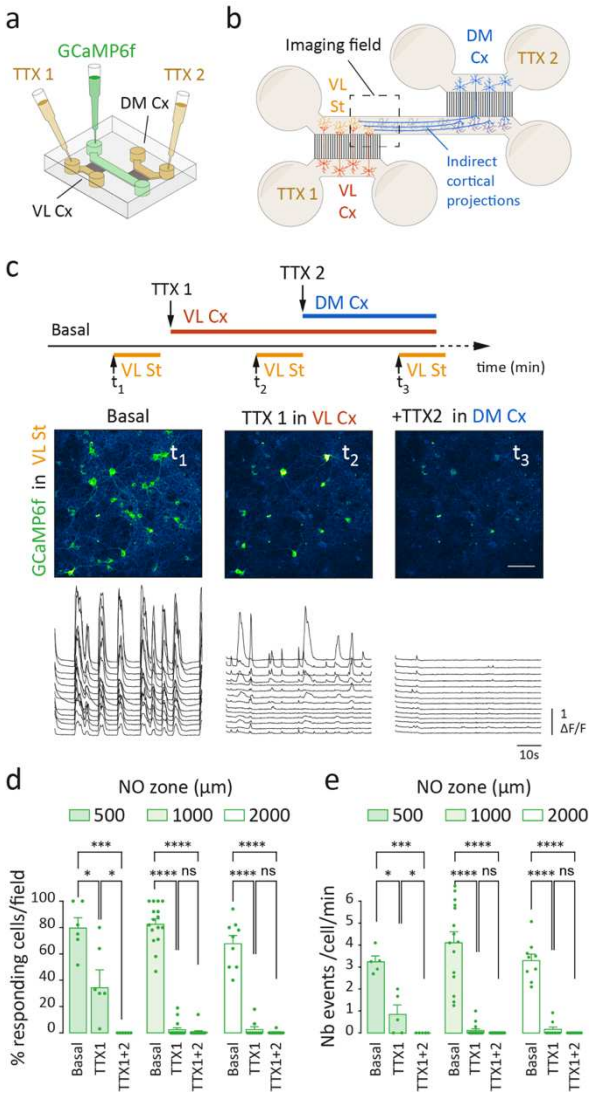



**Figure 4. Functional segregation of corticostriatal projections. (a)** Schematic of the microchip showing sequential TTX injections in the VL Cx compartment (TTX1) and in the DM Cx compartment (TTX2). (b) Striatal GCaMP6f activity was recorded in the VL St zone adjacent to the NO zone to assess the presence of functional connections by DM Cx axons. **(c)** Timeline of sequential TTX injections and GCaMP6f recordings. Microchips were left resting for at least 10 minutes before recording GCaMP6f activity in the VL St at $t_1$. TTX was injected in the corresponding VL Cx (5 min) before GCaMP6f recording in the VL St ($t_2$). TTX was then injected in the opposing DM Cx chamber before recording in the VL St ($t_3$). Live images of GCaMP6f-expressing striatal neurons with representative calcium traces before and after TTX treatments in the 500 µm configuration. Scale bar, 100 µm. **(d,e)** Quantification of striatal GCaMP6f activity responding to cortical inputs for each NO zone configuration, before and after sequential inhibition of cortical activity (TTX1, direct VL Cx inhibition; TTX2, indirect DM Cx inhibition), showed as percentage of responding cells (**d**, length effect : $F_{2,28}$=7.1, $p$<0.005; TTX effect : $F_{2,56}$=307.4, $p$<0.0001; *$p$<0.05, ***$p$<0.001, ****$p$<0.0001) and number of events per cell per min (**e**, TTX effect : $F_{2,52}$=116.8, $p$<0.0001; *$p$<0.05, ***$p$<0.001, ****$p$<0.0001; ; ns, non-significant; n=6-16 microchambers).

projecting VL Cx region is not sufficient to ompletely abolish GCaMP6f activity in VL St, as 39±11% cells still remained active in the field ($F_{2,56}$=307.4, $p$<0.0001, n=6 microchambers; $p$<0.05 compared to basal), each cell eliciting 0.8±0.2 events per minute in average ($F_{2,52}$=116.8, $p$<0.0001; $p$<0.05 compared to basal; **Figure 4d,e**). However, further addition of TTX in the opposing DM Cx chamber resulted in the complete loss of GCaMP activity in the VL St (percentage of responding cells, $p$<0.001 compared to basal; number of events, $p$<0.001 compared to basal), confirming that the striatal sub region of the 500 µm design receives indirect axonal projections from the opposing cortical chamber. In contrast, both 1000 and 2000 µm configurations showed efficient functional regionalization, as direct inhibition of VL Cx was sufficient to reduce the proportion of responding cells to respectively 2±1% and 3±2% (1000 µm, $p$<0.0001 compared to basal, n=16 microchambers; 2000 µm, $p$<0.0001 compared to basal, n=9 microchambers), with a mean of

0.1±0.05 and 0.1±0.1%, events per cell (1000 µm, $p$<0.0001 compared to basal; 2000 µm, $p$<0.0001 compared to basal; **Figure 4d,e**).

Although both 1000 and 2000 µm configurations efficiently created a non-overlapping zone at both structural and functional levels, the 2000 µm design extended the total length of the striatal chamber to 8000 µm. This dimension proved unsuitable for generating reproducible and homogeneous striatal cultures, as it frequently resulted in uncontrolled flow during cell seeding and medium changes, leading to higher shear stress and disruption of the uniformity of the striatal neuronal culture. Consequently, we selected the 1000 µm configuration with Tesla valve-shaped axonal microchannels to establish a four-node neural network model, in which two parallel corticostriatal pathways topographically project to their respective sub-striatal populations.

## Neurodevelopmental hyperactivity induces profound topographical reorganization of corticostriatal circuits

Several studies have underscored the central role of neuronal activity in the formation and alteration of neural circuits architecture. This is particularly the case within cortical and striatal networks, in which neuronal excitability regulates axonal growth and refining, as well as synaptic connectivity (Katz and Shatz, 1996; Hua et al., 2005; De Marco Garcia et al., 2011). Abnormal cortical activity level, such as hyperexcitability, is a common pathophysiological feature of various neuropsychiatric and neurodegenerative disorders. Alterations in potassium ion channel activity and expression is thought to contribute to the etiopathology of various psychiatric disorders. In particular, genetic mutations of the Kir2.1 potassium channel has been associated with neural network hyperactivity and dysfunctions in bipolar disorder, schizophrenia and autism spectrum disorder (Sicca et al., 2011; Imbrici et al., 2013; Ambrosini et al., 2014; Binda et al., 2018). We therefore investigated the impact of mutant Kir2.1-induced cortical hyperactivity on the global wiring diagram of our topographically segregated corticostriatal pathways. The fluidic isolation of the pre- and postsynaptic compartments provided the opportunity to selectively manipulate cortical neurons within the reconstituted network. We transfected cortical neurons with mutant Kir2.1, in which the GYG motif of the pore region is replaced with three Alanine (Kir2.1$^{AAA}$) (Preisig-Muller et al., 2002). Calcium imaging in the cortical chamber confirmed hyperactivity of Kir2.1$^{AAA}$-expressing neurons, as shown by the 3-fold increase in the number of elicited calcium transients ($F_{2,42}$=40.4, $p$<0.0001; ****$p$<0.0001 compared to control; n=15 neurons from 2 microchambers) and the 3.5-fold increase in amplitude after Kir2.1$^{AAA}$ expression ($F_{2,42}$=58.5, $p$<0.0001; ****$p$<0.0001 compared to control; **Figure 5a-c**).

The increase in cortical activity has a direct impact on striatal neurons within the field of direct projections, as evidenced by the percentage of responding striatal cells, which rises from 70±8% under control conditions to 92±3% in the Kir2.1$^{AAA}$ condition ($F_{1,15}$=63, $p$<0.0001; ****$p$<0.0001 compared to control; n=8-10 microchambers; **Figure 5d-f**). However, our analysis revealed that neither the frequency of events per neuron nor the amplitude of individual responses were significantly altered in the Kir2.1$^{AAA}$ condition compared to the control (3.8±0.6 event/cell/min in control chambers vs 4.4±0.6 event/cell/min in Kir$^{AAA}$ chambers). As expected in the 1000 µm control configuration, the application of TTX to the VL Cx chamber, which harbors direct-projecting neurons, completely abolished GCaMP6f activity in the corresponding VL St neurons (percentage responding cells, ****$p$<0.0001 compared to basal; number of events, ****$p$<0.0001 compared to basal; n=8 microchambers; **Figure 5e-f**). However, under Kir2.1$^{AAA}$ conditions, significant neuronal activity remained observable in the VL St neurons even after the inhibition of direct cortical projections (basal, 92±3%; TTX1, 66±10% responding cells; n.s). This residual activity cannot be attributed to a reduced efficacy of TTX on hyperactive neurons expressing Kir2.1$^{AAA}$, as TTX completely abolished the activity of Kir2.1$^{AAA}$-expressing neurons in the cortical chamber (****$p$<0.0001 compared to Kir2.1$^{AAA}$; **Figure 5b,c**). When TTX was applied to the opposite DM Cx chamber, GCaMP6f activity was entirely eliminated in the VL St (****$p$<0.0001 compared to basal; ***$p$<0.001 compared to TTX1), confirming that adjacent axonal projections invaded the target zone.

We next explored the functional disorganization resulting from

neurodevelopmental hyperactivity by building a graph theoretical analysis based on the GCaMP6f data (**Figure 5g**). We found that cortical hyperactivity primarily leads to the recruitment of additional striatal neurons within both the projection and the non-overlapping zone, rather than increasing the number of synaptic events or the strength of responses in individual neurons.This redistribution of connectivity results in a greater excitatory drive at the global population level, while maintaining similar activity profiles at the single-neuron level. Axonal invasion of the non-overlapping zone further destabilizes the topographical organization of the network, creating dysfunctional convergence nodes that receive inputs from opposing cortical regions

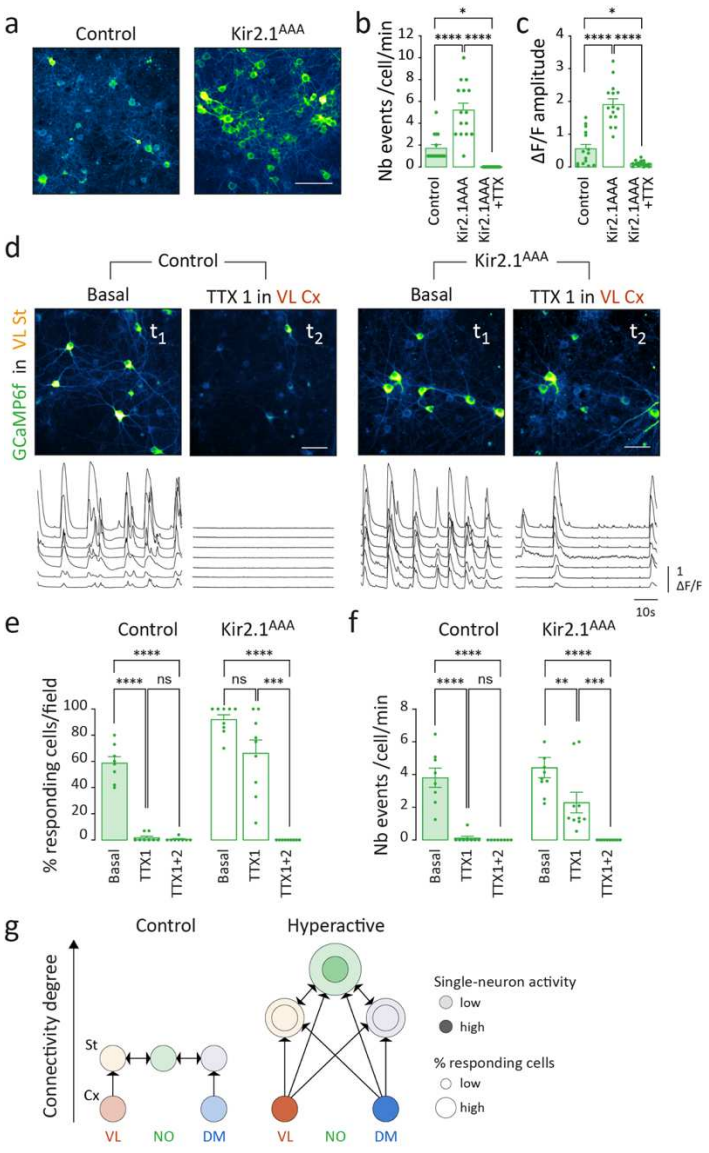



**Figure 5. Functional reorganization of hyperactive corticostriatal circuits. (a)** Live cell images of GCaMP6f-expressing cortical neurons in control and hyperactivated (Kir2.1$^{AAA}$) states. Scale bar, 100 µm. **(b,c)** Quantification of GCaMP6f activity in control and Kir2.1$^{AAA}$-expressing cortical neurons, showed as number of events per cell per min (**b**, $F_{2,42}$=40.4, $p$<0.0001; *$p$<0.05, ****$p$<0.0001) and event amplitude (**c**, $F_{2,42}$=58.5, $p$<0.0001; *$p$<0.05, ****$p$<0.0001; n=15 neurons from 2 microchambers). **(d)** Live cell images of GCaMP6f-expressing VL St neurons in control and hyperactivated (Kir2.1$^{AAA}$) states before and after TTX treatments in direct VL Cx. Scale bar, 100 µm. Representative calcium traces are shown below. **(e,f)** Quantification of striatal GCaMP6f activity responding to control and Kir2.1$^{AAA}$ cortical inputs, before and after sequential cortical inhibition, showed as percentage of responding cells (**e**, Kir2.1$^{AAA}$ effect: $F_{1,15}$=63, $p$<0.0001; ***$p$<0.0001) and number of events per cell per min (**f**, Kir2.1$^{AAA}$ effect: $F_{1,15}$=4.7, $p$<0.05; *$p$<0.05,

***$p$<0.0001; ns, non-significant; n=8 control and 10 Kir2.1$^{AAA}$ microchambers). **(g)** Theoretical graph representing the topographical organization and connectivity degree between each node of the reconstructed corticostriatal networks, in control and hyperactive conditions. Nodes are interconnected through directional edges. Each node is connected Color intensity of nodes corresponds to single-neuron activity (*i.e.* number of events), while node's diameter represents the percentage of responding cells in the field. Note the loss of hierarchical organization of hyperactive networks, showing selective changes in global versus individual excitatory drive connectivity reorganization and the emergence of a high-degree convergence node.

The recruitment of additional cells in both the target and the adjacent striatal region, without significantly changing the intrinsic activity of each neuron, may therefore enhance and expand network responsiveness, disorganizing the integration and processivity of information propagating within the network, without altering single-neuron properties (**Figure 5g**).

We next investigated when and how functional reorganization occurs in hyperactive networks. The standardized architecture of microchips allows to perform detailed, longitudinal analysis, tracking network development from early formation through to late maturation stages. We analyzed the structural dynamics of axonal branching and connectivity thanks to the spatiotemporal compartmentalization of the co-culture. We focused on key developmental time points [4, 7, 10, 14, and 21 days *in vitro* (DIV)] representing critical stages of network formation and maturation in microchips (Moutaux et al., 2018b). We mapped the structural evolution of corticostriatal projections using tdTomato, a fluorescent marker co-expressed with Kir2.1$^{AAA}$, which is cleaved off to diffuse freely throughout the cytoplasm, including into axonal compartments. Microchips were systematically subjected to high-resolution microscopy scanning of the whole striatal chamber to track and quantify structural evolution of the network overtime (**Figure 6a**). We observed that by DIV4, axonal projections from Kir2.1AAA-expressing neurons had already reached the striatal target zone, while control axons were still in the process of crossing the microchannels. In the control group, axonal fluorescence continued to increase steadily within the striatal target zone directly facing the microchannels between DIV7 and DIV14. From DIV18 onward, the control network began to stabilize and mature, corroborating our previous findings with reconstructed corticostriatal circuits on microchips (Moutaux et al., 2018b; Virlogeux et al., 2018). After DIV21, no further increase in axonal signal was observed within the striatal chamber, indicating that the network had reached structural maturity. At this stage, the network maintained a distinct topographical organization, with the majority of axonal fluorescence localized to the direct projection zone. In contrast, Kir2.1$^{AAA}$-expressing microchambers showed a continued increase in axonal signal across the entire striatal compartment, with significant invasion of the non-overlapping zone beginning at DIV14. By DIV18, the topographical organization of these hyperactive networks had fully collapsed, leading to the formation of a homogeneous projection zone that spanned the entire striatal compartment, including the non-overlapping region. This reorganization resulted in the creation of an intercortical convergence node, receiving inputs from both opposing cortical regions and disrupting the original segregation of projections.

Interestingly, we observed that the kinetics of axonal invasion between the direct projection field and the non-overlapping zone were significantly altered by cortical expression of Kir2.1$^{AAA}$. In the control group, axonal fluorescence increased similarly in both regions, though the signal consistently remained stronger in the direct projection zone, maintaining the segregated topographical organization of parallel corticostriatal circuits throughout network formation and maturation (**Figure 6b**). This created a stable difference in signal amplitude between the direct and non-overlapping zones, which was preserved over corticostriatal networks formation and maturation (**Figure 6c**). Axons in the Kir2.1$^{AAA}$ condition followed a similar growth trajectory within the direct projection zone, although their density was both amplified and accelerated. By DIV14, the axonal signal in the

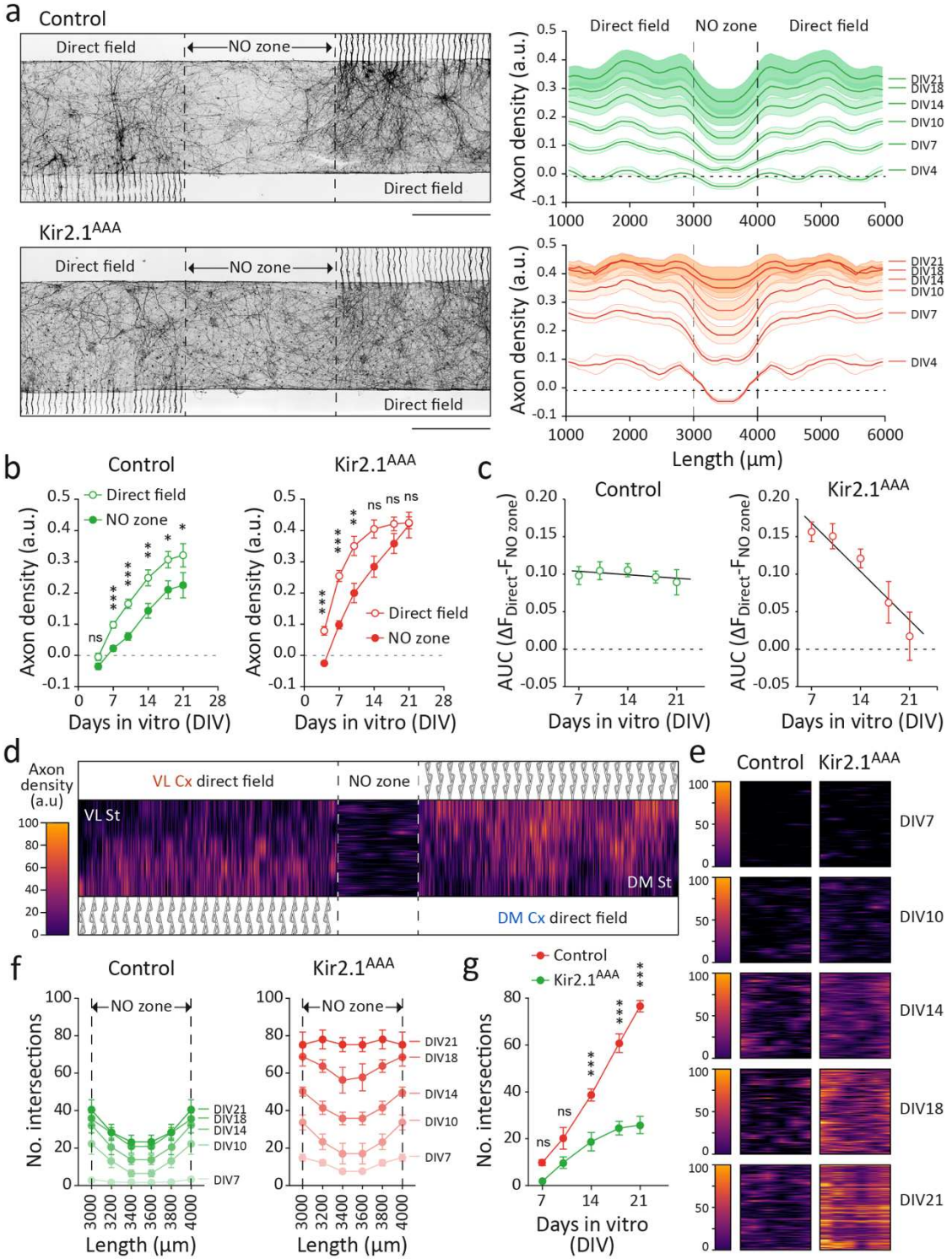

a
Control
Direct field
NO zone
Direct field
Kir2.1AAA
Direct field
NO zone
Direct field
Direct field
NO zone
Direct field
Axon density (a.u.)
DIV21
DIV18
DIV14
DIV10
DIV7
DIV4
Length (µm)
b
Control
Kir2.1AAA
Direct field
NO zone
Axon density (a.u.)
Days in vitro (DIV)
c
Control
Kir2.1AAA
AUC (ΔFDirect-FNO zone)
Days in vitro (DIV)
d
Axon density (a.u)
VL Cx direct field
NO zone
VL St
DM St
DM Cx direct field
e
Control
Kir2.1AAA
DIV7
DIV10
DIV14
DIV18
DIV21
f
Control
Kir2.1AAA
NO zone
No. intersections
Length (µm)
g
Control
Kir2.1AAA
No. intersections
Days in vitro (DIV)

**Figure 6. Spatiotemporal reorganization of hyperactive corticostriatal networks during development. (a)** Confocal images of control and Kir2.1$^{AAA}$-expressing cortical axons projecting into the striatal chamber. Note the axonal invasion of the NO zone by Kir2.1$^{AAA}$ cortical axons. Scale bar, 500 µm. Fluorescence profiles of cortical axons centered on the non-overlapping zone are plotted for each developmental time point (4, 7, 10, 14, 18 and 21 DIV; n=16 microchambers per DIV). **(b)** Average axon fluorescence in the direct projecting fields and in the NO zone during network development obtained from fluorescence profiles in **(a)**. Control conditions show similar growth kinetics between the direct projection field and the NO zone ($F_{5,147}$=0.48, ns), despite constant stronger signal in the direct projecting field ($F_{1,52}$=28.7, $p$<0.0001; *$p$<0.05, **$p$<0.01, ***$p$<0.001). Altered growth kinetics in Kir2.1$^{AAA}$-epxressing axons between the direct projecting fields and the NO zone ($F_{5,129}$=2.42, $p$<0.05; **$p$<0.01, ***$p$<0.001, ns. non-significant). **(c)** Area under the curves from **(b)** were used to calculate signal amplitudes between the direct and NO zones in control and Kir2.1$^{AAA}$ networks. Note that a negative slope is representative of a constant increase in axon invasion in the NO zone. **(d)** Representative heatmap of cortical axon branches in direct projecting fields and in the NO zone of the striatal compartment (see Materials and Methods for details). **(e)** Heatmap representations of the NO zone in control and Kir2.1$^{AAA}$ networks for each developmental time point. **(f)** Linear Sholl analysis of the NO zone showing the rapid increase in the number of intersections, in Kir2.1$^{AAA}$ conditions. **(g)** Average number of intersections in the NO zone at each developmental point showing accelerated axonal invasion by hyperactive cortical axons ($F_{4,75}$=18.6, $p$<0.0001; ***$p$<0.001; ns, non-significant; n=5 microchambers).

direct projection zone had already reached the maximum level observed in the control group by DIV21, stabilizing thereafter, much like in the control condition. However, axonal fluorescence in the non-overlapping zone increased linearly from DIV7 on, reaching its peak at DIV21 (**Figure 6b**). This linear increase in density suggest that neuronal hyperactivity not only accelerates axonal growth from the earliest stages of development, but also drives continued expansion, eventually leading to the invasion of the non-overlapping zone, equivalently saturating all neurons within the striatal chamber with connections (**Figure 6c**). We next utilized the space-time compartmentalization of neuronal networks on a chip to implement a custom linear Sholl analysis method, designed to capture the dynamics of axonal growth within the non-overlapping zone (**Figure 6d**). This method offers the advantage of providing a reproducible, quantitative, and automated longitudinal analysis of topographical network reorganization in response to genetic perturbations. To achieve this, we systematically segmented the microchambers with horizontal lines extending from the end of the microchannels to the opposite wall for the two direct projection zones, and with vertical lines across the width of the non-overlapping zone (see Materials and methods). Each axonal branch crossing these defined lines was recorded and integrated into a matrix mapping the entire striatal chamber (see Materials and methods for custom code). This heatmap representation of axonal density enabled rapid comparison of data for each neuronal compartment at defined developmental time points (DIV7, 10, 14, 18, and 21; **Figure 6e**). To better understand the reorganization kinetics of corticostriatal circuits, we focused specifically on the non-overlapping zone. The analysis revealed a striking effect of Kir2.1$^{AAA}$ expression on axonal growth and branching dynamics outside the direct projection zone. While the non-overlapping zone remained relatively devoid of axonal branches in control conditions—particularly in its central region—hyperactive Kir2.1$^{AAA}$-expressing axons began invading the entire area as early as DIV7, expanding from the periphery toward the center. Unlike the control group, where axonal growth rapidly reached a stable state, hyperactive networks continued expanding until a peak was reached at DIV21. By this point, the central non-overlapping zone contained 3.2 times more Kir2.1$^{AAA}$ axons than in controls (75±4 axons in the Kir2.1$^{AAA}$ group versus 23±3 axons in the control group, p<0.0001, *t*-Test; **Figure 6f**). This dramatic increase in axonal density was primarily driven by accelerated growth dynamics, with hyperexcitable axons growing at a rate 2.6 times faster than in control conditions (~1.8 new axons/day in the control group versus ~4.7 new axons/day in the Kir2.1$^{AAA}$ group; **Figure 6g**). These observations suggest that under conditions of hyperexcitability, corticostriatal networks not only fully invade their target regions but also rapidly expand into adjacent zones, eventually occupying the entire 7000 µm striatal

compartment. This accelerated and extensive axonal growth leads to a loss of topographical organization, contributing to the structural and functional disorganization of network activity.

## Discussion

Studying the complex reorganization of topographically wired neural networks remains a significant challenge, yet it is crucial to advancing our understanding of neurodevelopmental diseases. The primary difficulty lies in developing physiological models that preserve this intricate architecture, while providing access to external and/or genetic perturbations. Here, we present a biologically grounded model of neuronal network using a microfluidic on-a-chip device suitable for the longitudinal analysis of neurodevelopmental perturbations. By applying this device to hyperactive corticostriatal networks, we identified complex local and long-range network reorganization, highlighting early topographical reorganization and the emergence of dysfunctional convergent nodes.

### Reorganization of the wiring diagram in hyperactive networks creates new convergent nodes

Hyperactivity and disorganization of corticostriatal circuits are key features of various neurodevelopmental and psychiatric disorders (Shepherd, 2013; Wolfram and Baines, 2013; Nelson and Kreitzer, 2014). Despite their importance, understanding how, when and where these progressive defects occur remains elusive due to the technological limitations of *in vivo* studies. By transposing the topographical organization of corticostriatal networks onto a chip, we identified that accelerated growth of cortical projections withing striatal territories is a primary driver of the loss of topographic organization within hyperactive networks, resulting in the formation of dysfunctional convergence nodes.

Remarkably, although hyperexcitable axons increased the local density of connections at the population level in the target zone, this reorganization did not result in over-connection at the single-neuron level. This selective effect may be attributed to local competition between neighboring hyperexcitable axons, preventing over-connection on individual neurons (Hua et al., 2005; Singh and Miller, 2005). Instead, local connections redistributed across a broader target area, expanding excitatory input onto striatal territories without altering the electrophysiological properties at the single-neuron level. In addition to disrupting the local topography, cortical hyperexcitability also prompted the recruitment of neurons in adjacent regions. This invasion into previously unconnected territories expanded the network's connectivity map well beyond its original boundaries, significantly altering the balance between local and long-range connectivity. These findings align with prior studies where neuronal activity inhibition via Kir2.1 overexpression in cortical neurons reduced axonal growth and branching in contralateral target zones. However, in that case, hypoexcitable axons extended beyond their target area without forming stable connections (Wang et al., 2007). This distinction may arise from the differences in cortical networks investigated. In corticocortical circuits, the balance between pre- and post-synaptic activity is crucial for the proper formation of axonal projections (Huang et al., 2013; Suarez et al., 2014). In corticostriatal circuits, however, cortical axons connect to inhibitory GABAergic medium spiny neurons, which are highly hyperpolarized and electrically silent, both *in vitro* and *in vivo* (Nisenbaum and Wilson, 1995; Wilson and Kawaguchi, 1996). This disparity in membrane excitability between pre- and post-synaptic neurons in corticostriatal networks may accelerate the growth kinetics of cortical neurons as they invade the striatal compartment, leading to faster and more extensive cortical axonal expansion until all neurons in the adjacent region are connected to projections from neighboring areas.

The extension of hyperexcitable axons into adjacent regions, without altering the properties of individual neurons, suggests that reorganized nodes—though regionally aberrant—could still process information in a physiologically plausible manner. This may lead to the formation of new functional convergence nodes, potentially enabling the processing of information from unrelated cortical areas. Interestingly, axonal extension beyond the original target area has also been observed under physiological conditions, such as during extensive learning. Studies in primates have shown that axonal projections involved in tool-use motor learning can extend

over long distances (several millimeters) to invade areas typically devoid of connections in naïve animals (Hihara et al., 2006). In humans too, examples of large-scale axonal remodeling of cortical circuits have been reported. For example, the visual system of subjects trained to juggle undergo significant structural remodeling of the white matter, suggesting selective reconnections in cortical circuits (Draganski et al., 2004; Scholz et al., 2009). Extensive rearrangement of brain circuits after years of intensive training is also associated with the exceptional skills of professional pianists (Bengtsson et al., 2005) and of extreme foot users (Dempsey-Jones et al., 2019). This large-scale rewiring of hyperactive cortical circuits is believed to create new functional modules that support the acquisition of specific motor skills (Johansen-Berg, 2007; Bennett et al., 2018).

## Implications for neurodevelopmental and psychiatric diseases

These findings are also highly relevant for understanding neurodevelopmental connectopathies characterized by hyperactive regions—whether due to external perturbations or genetic mutations affecting neuronal excitability, where hyperactivity in certain cortical and striatal regions can lead to aberrant network expansion. This highlights the necessity for future studies to focus on specific subregions and suggests strategies for targeted therapeutics (Steinberg et al., 2015). For instance, autism spectrum disorders are characterized by a shift in the balance between local and long-range connectivity during embryonic and postnatal development, with hyperconnectivity observed in frontocortical circuits (Supekar et al., 2013; Allen and Morishita, 2024). Genetic risk factors associated with neurodevelopmental disorders also point to an imbalance between local and long-range inputs. For example, mutations in Mef2c, linked to both schizophrenia and autism spectrum disorders, result in excessive callosal long-range excitatory inputs (Rajkovich et al., 2017).

Current psychiatric medications offer only moderate symptom relief and do not effectively alter the course of disorders. Since many of these drugs were developed based on clinical observations, little is known about how they produce effects at the circuit level to alleviate symptoms. Antipsychotic drugs, for example, alleviate only a subset of schizophrenia symptoms, without addressing the primary cause of circuits dysfunctions (Hyman, 2012). Research increasingly suggests that intervention during neurodevelopment may be the most effective way to influence the course of psychiatric disorders (Krol and Feng, 2018). Given the dynamic changes in synapse number, function, and connectivity during development, intervening during these critical periods may help support normal development and provide lasting benefits. Our findings also indicate the need for rethinking current approaches to treatment design. Regionally targeted interventions, rather than broadly reducing network activity through systemic treatments may provide more effective-therapies for conditions marked by hyperactive, abnormal networks (Steinberg et al., 2015). Next-generation therapies, including pharmacological, electrical and optical strategies, should therefore aim at specific circuits, particularly those addressing dysfunctional convergence nodes. However, developing such circuit-based therapeutics requires a deeper understanding of the complex mechanisms governing network connectivity. This gap is further widened by the limited knowledge of how circuit connectivity and function mature in disorders with developmental components. To address these limitations, developing biologically grounded models of complex neural networks that allow for selective manipulation and direct observation of connectivity dynamics throughout development may offer unique platforms for advancing next-generation therapies.

## A minimalistic platform to analyze brain circuits architecture in health and neurodevelopmental diseases

The brain is increasingly recognized as a system of interrelated networks that follow intricate topographical patterns. This shift in understanding highlights the importance of examining brain connectivity from a network-centric perspective, rather than viewing it as separate circuits (Sporns, 2014). Corticostriatal pathways, in particular, demonstrate this complexity through their organization into subnetworks, where specific zones allow for the convergence and divergence of information (Flaherty and Graybiel, 1991;

Berendse et al., 1992; Hoffer and Alloway, 2001; Mailly et al., 2013; Averbeck et al., 2014; Hintiryan et al., 2016). However, the complex nature of topographically structured neural networks has long posed a significant challenge for neurodevelopmental disorders. Traditional *in vitro* models have struggled to capture the full complexity of these networks, often falling short in replicating both their structural and functional aspects (Zhao et al., 2020). This limitation has hindered our ability to gain deeper insights into the mechanisms underlying circuit reorganization, a crucial component in understanding various neurodevelopmental conditions. Our platform addresses this longstanding issue by providing a more accurate and dynamic representation of how neuronal circuits respond to genetic or environmental perturbations. One key advantage of microfluidic platforms is the precise control of geometric parameters and environmental factors it offers, allowing for highly controlled experiments and a better simulation of how neuronal circuits respond to genetic and environmental changes. Moreover, monolayered cultures on a single optical plane design enables clearer observations, which improves spatial and temporal imaging capabilities. This feature, along with the integration of advanced analytical tools, facilitates real-time observation of axonal reorganization during development, offering insights into both local and long-range circuit dynamics. Another important feature of microfluidic on-a-chip platforms is the standardized nature of culture conditions, enhancing consistency across experiments, and improving the reliability of findings in neurodevelopmental studies.

This novel approach may serve as a complementary tool to *in vivo* and human imaging studies, offering a minimalistic yet highly informative model of neural network formation and rearrangement. By bridging the gap between oversimplified *in vitro* models and the complexity of *in vivo* systems, our platform opens new avenues for investigating the effects of genetic and environmental factors on neural circuit development and may help biomedical actors to develop next-generation neurotherapies. Our minimalistic platform may serve as an effective pre-screening tool that can be adapted to human neurons to develop characteristic changes similar to what is observed in neurological disorders before transitioning to more advanced and complex *in vivo* models. This strategy may allow precise mechanistic characterization in a bottom-up efficient approach to study neural network alteration and dysfunctions. By providing a more accurate representation of neuronal circuit response to genetic perturbations, our platform may therefore open new avenues for investigating neurodevelopmental disorders.

## Materials and methods

### Microfluidics fabrication

Polydimethylsiloxane (PDMS) microfluidic devices were fabricated and prepared as previously described (Virlogeux et al., 2018). Briefly, a master mold was made with SU-8 photoresist on a silicon wafer using a dual thickness photolithography process. A first layer of SU-8 2005 (5µm high) was spin-coated on a 3-inch silicon wafer, then baked, exposed and developed for defining the microchannels. A second layer of SU-8 2100 (100µm high) was subsequently spin coated and aligned over the first level and was developed to build seeding chambers. Note that a short silicon over-etching was performed with reactive ion etching between the two steps so that the microchannels pattern was visible for alignment of the second mask. Silicon wafers were then replicated using epoxy resin (resin epoxy R123, SoloPlast) and PDMS microfluidic chips were prepared using a 10:1 mix of silicon elastomer and its curing agents (Sylgard 184, Dow Corning). Air bubbles were removed by vacuum for 1h and PDMS polymerization was achieved at 70 °C for 1 h 30 minutes. PDMS microfluidics chips were then unmolded, cut to create seeding wells, cleaned by sonication in 100% ethanol, rinsed with distilled water and dried at 60 °C. Bonding the chips with FluoroDish (FD35-100, ThermoFisher Scientific) were performed using a low-pressure plasma treatment (Femto plasma cleaner, Diener Electronic, Germany) for 30 seconds for surface activation. Bonding was sealed at 60°C for 15 minutes to create covalent bonds between the microfluidics chips and the FluoroDish. Microfluidic devices were then subjected to a 10 second plasma treatment just before the coating. Coating was performed overnight at 4°C with poly-D-lysine (0.1 mg/ml) in the cortex chambers and with a mix of poly-D-lysine (0.1 mg/ml) and

laminin (5 µg/ml) in the striatal chamber. The microchips were carefully washed before plating with growth medium (Neurobabasal medium supplemented with 2% B27, 1% Glutamine 200 mM, and 1% penicillin/streptomycin) to remove excess coating, and were placed at 37°C before neurons were plated. Microchambers were carefully inspected every 2-3 days and before experiments.

### Nanobeads videotracking

Polystyrene beads (diameter 500 nm, cat. #59769, Merck) were diluted at final concentration of 1:5000 (v/v) in MilliQ water. Beads in solution were sonicated for 20 minutes to prevent clusters. Microfluidic chips were activated trough plasma atmosphere at 4 mbar air for 2 minutes. Each chamber was pre-filled with 10 µL of MilliQ water to assure homogenous filling and flow stabilization inside microchannels. Acquisitions were made on a custom inverted microscope ($N.A_{illumination}$=0.3) with a ×60 oil objective ($N.A_{detection}$=1.3, Olympus). Wavefront images were acquired using a custom Quadrivalve Lateral Shearing Interferometry (QLSI) camera system at a 15Hz frame rate (Bon et al., 2009).

### Primary neuronal cultures

Cortex and ganglionic eminences were dissected from e17.5 rat embryos and digested enzymatically with trypsin, followed by two incubations with trypsin inhibitor solutions, and finally dissociated mechanically. Dissociated striatal and cortical neurons were resuspend in growth medium (5 x $10^6$ cells in 140 µl for cortical neurons, and in 70 µl for striatal neurons), and plated in seeding chambers at a final density of 3500 cells/$mm^2$ for cortical neurons, and 7000 cells/$mm^2$ for striatal neurons. Cells were left in the incubator for at least 3h to allow cell adhesion, then all compartments were carefully filled with growth medium.

**Constructs and viruses.** Neurons were either infected with lentiviruses (LV) and adeno-associated viruses (AAV) one day after plating (DIV 1) for 24h, or were electroporated with plasmids using Amaxa Nucleofactor (Lonza) before plating. The following constructs, LVs and AAVs were used for the study: pRRLSIN.cPPT.hPKG-GFP (Addgene #12252),), pCAG-Kir2.1Mut-T2A-tdTomato (Addgene #60644), AAV9.CamKII.GCaMP6f (Addgene #100834-AAV9), pLV.PKG.GFP (Addgene #12252-LV) and pLV.CMV.Cherry (Addgene #36084-LV).

### Immunostaining and confocal imaging

Neurons were fixed by filling the microchambers with PFA/Sucrose (4%/4% in PBS) for 20 min at room temperature (RT) followed by PBS washes and were incubated for 1h at RT with a blocking solution (BSA 1%, normal donkey serum 2%, Triton X-100 0.1%). Cortical and striatal chambers were then incubated with anti-GFP (ThermoFisher Scientific, #A10262, 1:1000) polyclonal primary antibody overnight at 4 °C and appropriate fluorescent secondary antibodies were incubated for 1h at RT. The immunofluorescence was maintained in PBS for a maximum of one week in the dark at 4 °C before confocal acquisitions. Immunostainings were acquired with a ×10 objective (0.3 NA) using an inverted confocal microscope (Eclipse Ti2, Nikon) coupled to a spinning-disk confocal system (CSU-W1, Yokogawa) connected to a wide field sCMOS camera (Orca-Fusion BT, Hammamatsu). GFP-positive axons were imaged in the striatal chamber using multidimensional (x,y,z) acquisitions and were reconstructed as a single mosaic with a 25% (x,y) overlap. For axonal directionality experiments, microchips were maintained at 37 °C and 5% CO2 and live axons expressing endogenous GFP were imaged in microchannels with a ×60 objective (1.49 NA). The system is driven by NIS-Elements (Nikon Instruments)

### Live cell videomicroscopy

Live-cell recordings of GCaMP6f signals were performed using an inverted microscope (Axio Observer, Zeiss) coupled connected to wide field hight sensitivity sCMOS camera (Prime BSI Express, Photometrics) and maintained at 37 °C and 5% CO2. GCaMP6f images were taken every 200 ms for 60s using a ×25 oil-immersion objective (0.8 NA). The system is driven by Metamorph Imaging System Premier (Molecular Devices).

### Quantifications and image analysis

*Nanobeads flow analysis*. Wavefront images were reconstructed using an open-source MATLAB toolbox (available at https://github.com/baffou/PhaseLAB). The flow

of beads was detected and tracked using an open-source ImageJ plugin (Ershov et al., 2022). Temporal average values were subtracted to the individual frames to remove static components of the movies and the position of each bead was instantly analyzed on each frame using custom MATLAB scripts. Events that were tracked for less than 20 frames were considered as outliners. We estimated the Net velocity of nanobeads (Δv) by calculating the difference between Forward and Reverse average velocity of nanobeads for each volume differentials (ΔV). At least 8 microchambers were imaged, with approximatively 300 moving nanobeads per acquisitions for each ΔV.

*Analysis of axonal directionality.* Live imaging of GFP-expressing axons was performed at DIV4, 7, 10, 18, and 21. We estimated axonal directionality at DIV18, by quantifying the number of GFP-positive axons entering the microchannels from one compartment and exiting into the other compartment (striatum-to-cortex, or cortex-to-striatum).

*Axonal directionality.* We estimated axonal directionality by calculating the proportion of exiting axons relative to the number of axons entering. Each design was tested using 10 fields per chamber from at least 14 microchambers prepared from 4 independent cultures. Global axonal diodicity was evaluated by calculating the proportion of striatum-to-cortex axons relative to the number of cortex-to-striatum axonal projections from at least 4 microchambers prepared from 3 independent cultures.

*Live cell calcium analysis.* Calcium activity was analyzed between DIV18 and DIV21. Neurons were left to rest for 10 min before recording. Tetrodotoxin (TTX, 5µM) was diluted in fresh medium and applied in the cortical compartment using inter-chamber differential pressure, which limits the diffusion of liquids between the striatal and cortical chambers. Cortical neurons were incubated for at least 5 minutes at 37°C before live cell imaging. Calcium fluorescence images were processed using ImageJ (FIJI v2.1.0, https://imagej.nih.gov/ij/) and analyzed using Matlab 2014b. Regions of interests (*i.e* neuronal soma) were delineated manually and ΔF/F traces were calculated using FluoroSNNAP software for Matlab (Patel et al., 2015). Regions of interest were conserved between acquisitions to follow the response of the network between different conditions. Calcium event detection was performed with homemade functions (available at https://github.com/PoinsotM/Code). Acquisition fields were randomly distributed along the striatal chamber and all responding cells in the field were defined as regions of interest. Events were detected when the ΔF/F value was over five standard deviations of the ΔF/F background signal. The program detected the number and amplitude of each event. Each condition was tested using at least 6 microchambers from 6 independent cultures for evaluating the 500, 1000 and 2000 µm designs. Kir2.1$^{AAA}$ functional effect was analyzed using at least 8 microchambers from 5 independent cultures, except for cortical calcium activity where 2 microchambers prepared from one culture were used.

*Axonal density analysis.* Axonal density was analyzed in the striatal compartment using mosaic reconstruction with ImageJ (FIJI v2.1.0). A region of interest encompassing the entire striatal chamber, centered within the non-overlapping zone, was used to quantify the overall fluorescence signal. After background subtraction, the signal was plotted as a function of the longitudinal coordinates of the chamber. Each design (500, 1000 and 2000 µm) was tested using at least 4 distinct microchambers from 4 independent cultures. Kir2.1$^{AAA}$ structural effect was tested using at least 16 microchambers per DIV and per condition from 9 independent cultures.

*Linear Sholl analysis.* The striatal compartment was segmented with horizontal lines from the end of the microchannels to the opposite wall for the two direct projection zones every 180 µm, and with vertical lines across the width of the non-overlapping zone every 166 µm, using ImageJ (FIJI v2.1.0). Images were binarized and the color scale was inverted so that cortical axons invading the area had a pixel value of 255, while the background was assigned a value of 0. Pixel intensity profiles (0 or 255) were extracted along each line to estimate the number of axonal intersections. These intensity profiles were also used in a custom Python algorithm to provide a heatmap representation of axonal density probability at each DIV (code available at https://github.com/PoinsotM/Code). Five micro-

chambers from 16 microchambers were randomly distributed at each DIV.

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Prism10 (GraphPad Software). The fluidic diode effect (nanobeads), functional regionalization of the three designs (500, 1000, 2000 µm), functional invasion of Kir2.1$^{AAA}$ in the non-overlapping zone, the kinetics of axonal invasion between the direct projection field and the non-overlapping zone, and the linear Sholl analysis overtime were analyzed using two-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test. Axonal unidirectionality studies (Tesla, Arrow, Arch), and cortical calcium activity were analyzed using one-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test. Global axonal diodicity between Tesla and Arrow geometries were compared using unpaired two-tailed Student's t-test. Results are expressed as mean ± SEM. The criterion for statistical significance was set at $p<0.05$.

## Acknowledgments

We thank Kim Mormentyn, Amelle Nasri and Catherine Lepolard for technical support; Genevieve Rougon for critical comments on the manuscript; Sophie Halliez and members of the lab for helpful discussions; E. Nivet's team (INP, CNRS, Aix Marseille Université, UMR7051) and the NeuroBioTools cloning facility (INT, CNRS, Aix Marseille Université, UMR7289) for lentivirus production; NCIS imaging facility at INP for image acquisitions; and the Neurotechnology Center at INT for microchip production, and live cell imaging. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE16-0027, ANR-22-CE17-0034), Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT-CIFRE-2021/1043), Fondation France Alzheimer (2021-6239), Institut Carnot STAR, and Fond d'Investissement INT. This work has received support from the French government under the Programme «Investissements d'Avenir», Initiative d'Excellence d'Aix-Marseille Université via AMIDEX funding (AMX-19-IET-004), and ANR (ANR-17-EURE-0029).

## Author contributions

Conceptualization, M.P. and M.C.; Methodology, M.P., B.M., B.C. and M.C.; Investigation, M.P., M.D.S., B.M., A.B.C. and B.C.; Formal Analysis, M.P., B.M., M.D.S. and M.C.; Writing – Original Draft, M.P., and M.C.; Writing – Review & Editing, M.P., M.D.S., B.M., A.B.C., E.G.G, B.C. and M.C.; Funding Acquisition, E.G.G. and M.C.; Supervision, E.G.G. and M.C.

## Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

## References

Ahmari SE, Spellman T, Douglass NL, Kheirbek MA, Simpson HB, Deisseroth K, Gordon JA, Hen R (2013) Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior. Science (New York, NY 340:1234-1239.

Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. Annu Rev Neurosci 9:357-381.

Allen SJ, Morishita H (2024) Local and long-range input balance: A framework for investigating frontal cognitive circuit maturation in health and disease. Sci Adv 10:eadh3920.

Ambrosini E et al. (2014) Genetically induced dysfunctions of Kir2.1 channels: implications for short QT3 syndrome and autism-epilepsy phenotype. Human molecular genetics 23:4875-4886.

Averbeck BB, Lehman J, Jacobson M, Haber SN (2014) Estimates of projection overlap and zones of convergence within frontal-striatal circuits. J Neurosci 34:9497-9505.

Bengtsson SL, Nagy Z, Skare S, Forsman L, Forssberg H, Ullen F (2005) Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. Nature neuroscience 8:1148-1150.

Bennett SH, Kirby AJ, Finnerty GT (2018) Rewiring the connectome: Evidence and effects. Neurosci Biobehav Rev 88:51-62.

Berendse HW, Galis-de Graaf Y, Groenewegen HJ (1992) Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. The Journal of comparative neurology 316:314-347.

Binda A, Rivolta I, Villa C, Chisci E, Beghi M, Cornaggia CM, Giovannoni R, Combi R (2018) A Novel KCNJ2 Mutation Identified in an Autistic Proband Affects the Single Channel Properties of Kir2.1. Front Cell Neurosci 12:76.

Bon P, Maucort G, Wattellier B, Monneret S (2009) Quadriwave lateral shearing interferometry for

quantitative phase microscopy of living cells. Opt Express 17:13080-13094.

Bullmore E, Sporns O (2009) Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. Nat Rev Neurosci 10:186-198.

Bullmore ET, Frangou S, Murray RM (1997) The dysplastic net hypothesis: an integration of developmental and dysconnectivity theories of schizophrenia. Schizophrenia research 28:143-156.

Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. Nature 499:295-300.

Crossley NA, Mechelli A, Scott J, Carletti F, Fox PT, McGuire P, Bullmore ET (2014) The hubs of the human connectome are generally implicated in the anatomy of brain disorders. Brain 137:2382-2395.

Dauth S, Maoz BM, Sheehy SP, Hemphill MA, Murty T, Macedonia MK, Greer AM, Budnik B, Parker KK (2017) Neurons derived from different brain regions are inherently different in vitro: a novel multiregional brain-on-a-chip. Journal of neurophysiology 117:1320-1341.

De Marco Garcia NV, Karayannis T, Fishell G (2011) Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. Nature 472:351-355.

Dempsey-Jones H, Wesselink DB, Friedman J, Makin TR (2019) Organized Toe Maps in Extreme Foot Users. Cell Rep 28:2748-2756 e2744.

Draganski B, Gaser C, Busch V, Schuierer G, Bogdahn U, May A (2004) Neuroplasticity: changes in grey matter induced by training. Nature 427:311-312.

Ershov D, Phan MS, Pylvanainen JW, Rigaud SU, Le Blanc L, Charles-Orszag A, Conway JRW, Laine RF, Roy NH, Bonazzi D, Dumenil G, Jacquemet G, Tinevez JY (2022) TrackMate 7: integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines. Nat Methods 19:829-832.

Flaherty AW, Graybiel AM (1991) Corticostriatal transformations in the primate somatosensory system. Projections from physiologically mapped body-part representations. Journal of neurophysiology 66:1249-1263.

Gladkov A, Pigareva Y, Kutyina D, Kolpakov V, Bukatin A, Mukhina I, Kazantsev V, Pimashkin A (2017) Design of Cultured Neuron Networks in vitro with Predefined Connectivity Using Asymmetric Microfluidic Channels. Sci Rep 7:15625.

Graybiel AM (2008) Habits, rituals, and the evaluative brain. Annu Rev Neurosci 31:359-387.

Haber SN (2003) The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. J Chem Neuroanat 26:317-330.

Hasan MF, Berdichevsky Y (2016) Neural Circuits on a Chip. Micromachines (Basel) 7.

Hihara S, Notoya T, Tanaka M, Ichinose S, Ojima H, Obayashi S, Fujii N, Iriki A (2006) Extension of corticocortical afferents into the anterior bank of the intraparietal sulcus by tool-use training in adult monkeys. Neuropsychologia 44:2636-2646.

Hintiryan H, Foster NN, Bowman I, Bay M, Song MY, Gou L, Yamashita S, Bienkowski MS, Zingg B, Zhu M, Yang XW, Shih JC, Toga AW, Dong HW (2016) The mouse cortico-striatal projectome. Nature neuroscience 19:1100-1114.

Hoffer ZS, Alloway KD (2001) Organization of corticostriatal projections from the vibrissal representations in the primary motor and somatosensory cortical areas of rodents. The Journal of comparative neurology 439:87-103.

Holloway PM, Hallinan GI, Hegde M, Lane SIR, Deinhardt K, West J (2019) Asymmetric confinement for defining outgrowth directionality. Lab Chip 19:1484-1489.

Holloway PM, Willaime-Morawek S, Siow R, Barber M, Owens RM, Sharma AD, Rowan W, Hill E, Zagnoni M (2021) Advances in microfluidic in vitro systems for neurological disease modeling. J Neurosci Res 99:1276-1307.

Honegger T, Thielen MI, Feizi S, Sanjana NE, Voldman J (2016) Microfluidic neurite guidance to study structure-function relationships in topologically-complex population-based neural networks. Sci Rep 6:28384.

Hua JY, Smear MC, Baier H, Smith SJ (2005) Regulation of axon growth in vivo by activity-based competition. Nature 434:1022-1026.

Huang Y, Song NN, Lan W, Zhang Q, Zhang L, Zhang L, Hu L, Chen JY, Zhao CJ, Li L, Xu L, Ding YQ (2013) Sensory input is required for callosal axon targeting in the somatosensory cortex. Molecular brain 6:53.

Hyman SE (2012) Revolution stalled. Sci Transl Med 4:155cm111.

Imbrici P, Camerino DC, Tricarico D (2013) Major channels involved in neuropsychiatric disorders and therapeutic perspectives. Front Genet 4:76.

Johansen-Berg H (2007) Structural plasticity: rewiring the brain. Curr Biol 17:R141-144.

Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. Science (New York, NY 274:1133-1138.

Krol A, Feng G (2018) Windows of opportunity: timing in neurodevelopmental disorders. Current opinion in neurobiology 48:59-63.

Liu Y, Liang M, Zhou Y, He Y, Hao Y, Song M, Yu C, Liu H, Liu Z, Jiang T (2008) Disrupted small-world networks in schizophrenia. Brain 131:945-961.

Mailly P, Aliane V, Groenewegen HJ, Haber SN, Deniau JM (2013) The rat prefrontostriatal system analyzed in 3D: evidence for multiple interacting functional units. J Neurosci 33:5718-5727.

Milad MR, Rauch SL (2012) Obsessive-compulsive disorder: beyond segregated cortico-striatal pathways. Trends Cogn Sci 16:43-51.

Miny L, Maisonneuve BGC, Quadrio I, Honegger T (2022) Modeling Neurodegenerative Diseases Using In Vitro Compartmentalized Microfluidic Devices. Front Bioeng Biotechnol 10:919646.

Moutaux E, Charlot B, Genoux A, Saudou F, Cazorla M (2018a) An integrated microfluidic/microelectrode array for the study of activity-dependent intracellular dynamics in neuronal networks. Lab on a Chip 18:3425-3435.

Moutaux E, Christaller W, Scaramuzzino C, Genoux A, Charlot B, Cazorla M, Saudou F (2018b) Neuronal network maturation differently affects secretory vesicles and mitochondria transport in axons. Scientific Reports 8:13429.

Nelson AB, Kreitzer AC (2014) Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. Annu Rev Neurosci 37:117-135.

Neto E, Leitao L, Sousa DM, Alves CJ, Alencastre IS, Aguiar P, Lamghari M (2016) Compartmentalized Microfluidic Platforms: The Unrivaled Breakthrough of In Vitro Tools for Neurobiological Research. J Neurosci 36:11573-11584.

Nguyen QM, Abouezzi J, Ristroph L (2021) Early turbulence and pulsatile flows enhance diodicity of Tesla's macrofluidic valve. Nat Commun 12:2884.

Nikolakopoulou P, Rauti R, Voulgaris D, Shlomy I, Maoz BM, Herland A (2020) Recent progress in translational engineered in vitro models of the central nervous system. Brain 143:3181-3213.

Nisenbaum ES, Wilson CJ (1995) Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. J Neurosci 15:4449-4463.

Nowinski WL (2017) Human brain atlasing: past, present and future. Neuroradiol J 30:504-519.

Oh SW et al. (2014) A mesoscale connectome of the mouse brain. Nature 508:207-214.

Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. Brain Res Brain Res Rev 20:91-127.

Patel TP, Man K, Firestein BL, Meaney DF (2015) Automated quantification of neuronal networks and single-cell calcium dynamics using calcium imaging. J Neurosci Methods 243:26-38.

Peyrin JM, Deleglise B, Saias L, Vignes M, Gougis P, Magnifico S, Betuing S, Pietri M, Caboche J, Vanhoutte P, Viovy JL, Brugg B (2011) Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. Lab Chip 11:3663-3673.

Preisig-Muller R, Schlichthorl G, Goerge T, Heinen S, Bruggemann A, Rajan S, Derst C, Veh RW, Daut J (2002) Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:7774-7779.

Purwidyantri A, Prabowo BA (2023) Tesla Valve Microfluidics: The Rise of Forgotten Technology. Chemosensors 11:256.

Rajkovich KE, Loerwald KW, Hale CF, Hess CT, Gibson JR, Huber KM (2017) Experience-Dependent and Differential Regulation of Local and Long-Range Excitatory Neocortical Circuits by Postsynaptic Mef2c. Neuron 93:48-56.

Renault R, Durand JB, Viovy JL, Villard C (2016) Asymmetric axonal edge guidance: a new paradigm for building oriented neuronal networks. Lab Chip 16:2188-2191.

Royer J, Bernhardt BC, Lariviere S, Gleichgerrcht E, Vorderwulbecke BJ, Vulliemoz S, Bonilha L (2022) Epilepsy and brain network hubs. Epilepsia 63:537-550.

Scholz J, Klein MC, Behrens TE, Johansen-Berg H (2009) Training induces changes in white-matter architecture. Nature neuroscience 12:1370-1371.

Shepherd GM (2013) Corticostriatal connectivity and its role in disease. Nat Rev Neurosci 14:278-291.

Sicca F, Imbrici P, D'Adamo MC, Moro F, Bonatti F, Brovedani P, Grottesi A, Guerrini R, Masi G, Santorelli FM, Pessia M (2011) Autism with seizures and intellectual disability: possible causative role of gain-of-function of the inwardly-rectifying K+ channel Kir4.1. Neurobiology of disease 43:239-247.

Singh KK, Miller FD (2005) Activity regulates positive and negative neurotrophin-derived signals to determine axon competition. Neuron 45:837-845.

Sporns O (2014) Contributions and challenges for network models in cognitive neuroscience. Nature neuroscience 17:652-660.

Steinberg EE, Christoffel DJ, Deisseroth K, Malenka RC (2015) Illuminating circuitry relevant to psychiatric disorders with optogenetics. Current opinion in neurobiology 30:9-16.

Suarez R, Fenlon LR, Marek R, Avitan L, Sah P, Goodhill GJ, Richards LJ (2014) Balanced interhemispheric cortical activity is required for correct targeting of the corpus callosum. Neuron 82:1289-1298.

Supekar K, Uddin LQ, Khouzam A, Phillips J, Gaillard WD, Kenworthy LE, Yerys BE, Vaidya CJ, Menon V (2013) Brain hyperconnectivity in children with autism and its links to social deficits. Cell Rep 5:738-747.

Taylor AM, Dieterich DC, Ito HT, Kim SA, Schuman EM (2010) Microfluidic local perfusion chambers for the visualization and manipulation of synapses. Neuron 66:57-68.

Taylor AM, Blurton-Jones M, Rhee SW, Cribbs DH, Cotman CW, Jeon NL (2005) A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. Nat Methods 2:599-605.

Tesla N (1920) Valvular conduit. In: International Patent, p 03.02.1920.

van der Meer AD, van den Berg A (2012) Organs-on-chips: breaking the in vitro impasse. Integr Biol (Camb) 4:461-470.

Virlogeux A, Moutaux E, Christaller W, Genoux A, Bruyere J, Fino E, Charlot B, Cazorla M, Saudou F (2018) Reconstituting Corticostriatal Network on-a-Chip Reveals the Contribution of the Presynaptic Compartment to Huntington's Disease. Cell Reports 22:110-122.

Virlogeux A, Scaramuzzino C, Lenoir S, Carpentier R, Louessard M, Genoux A, Lino P, Hinckelmann MV, Perrier AL, Humbert S, Saudou F (2021) Increasing brain palmitoylation rescues behavior and neuropathology in Huntington disease mice. Sci Adv 7.

Wang CL, Zhang L, Zhou Y, Zhou J, Yang XJ, Duan SM, Xiong ZQ, Ding YQ (2007) Activity-dependent development of callosal projections in the somatosensory cortex. J Neurosci 27:11334-11342.

Wilson CJ, Kawaguchi Y (1996) The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. J Neurosci 16:2397-2410.

Winter-Hjelm N, Sikorski P, Sandvig A, Sandvig I (2024) Engineered cortical microcircuits for investigations of neuroplasticity. Lab Chip.

Winter-Hjelm N, Brune Tomren A, Sikorski P, Sandvig A, Sandvig I (2023) Structure-function dynamics of engineered, modular neuronal networks with controllable afferent-efferent connectivity. J Neural Eng 20.

Wolfram V, Baines RA (2013) Blurring the boundaries: developmental and activity-dependent determinants of neural circuits. Trends in neurosciences 36:610-619.

Yi Y, Park J, Lim J, Lee CJ, Lee SH (2015) Central Nervous System and its Disease Models on a Chip. Trends in biotechnology 33:762-776.

Zeng K, Kang J, Ouyang G, Li J, Han J, Wang Y, Sokhadze EM, Casanova MF, Li X (2017) Disrupted Brain Network in Children with Autism Spectrum Disorder. Sci Rep 7:16253.

Zhao Y, Demirci U, Chen Y, Chen P (2020) Multiscale brain research on a microfluidic chip. Lab Chip 20:1531-1543.

# Principaux résultats et discussions de l'étude 1

## *Contrôle directionnel des projections axonales*

Nous avons utilisé des microcanaux inspirés des valves Tesla pour assurer la croissance unidirectionnelle des axones corticaux vers les neurones striataux, tout en caractérisant l'effet de diode fluidique. Ce design a démontré une efficacité supérieure par rapport aux géométries conventionnelles (arches et flèches), avec des projections axonales quatre fois plus importantes dans la direction cortico-striatale que dans la direction striato-corticale. De plus, l'effet de diode fluidique stable permet une compartimentation précise et le contrôle de la diffusion des gradients. Ce contrôle directionnel est essentiel pour modéliser des réseaux neuronaux tels que le réseau corticostriatal, dans un design compact et optimisé sur le plan fluidique. D'un point de vue technique, nous pourrions encore améliorer la directionnalité en ajoutant des électrodes pour générer des potentiels électriques permettant de contrôler le passage des axones, comme démontré dans l'étude de *Honegger et al.* (Honegger et al. 2013). Néanmoins, nous voulions garder la complexité du dispositif à son minimum pour améliorer sa facilité d'utilisation et sa reproductibilité.

## *Reconstitution topographique du réseau corticostriatal*

En utilisant un modèle de cerveau-sur-puce tricompartiment, nous avons modélisé l'organisation topographique des projections sensorimotrices et préfrontales médiales, respectivement vers les régions ventrolatérales et dorsomédiales du striatum. Nous avons observé que le cortex connecte préférentiellement le striatum directement à la sortie de ses microcanaux et envahit peu les zones plus éloignées. Ainsi, en ajustant la distance séparant les zones de projection des deux régions corticales, il est possible de créer une zone striatal de non-recouvrement sans projections corticales, permettant l'établissement d'un réseau

topographiquement ségrégué. Les capacités intrinsèques des cerveaux-sur-puces, telles que la compartimentation fluidique, la séparation des corps cellulaires et des projections axonales, ainsi que la facilité d'accès optique, nous ont permis de caractériser de manière précise la mise en place du réseau et sa fonctionnalité. Nous avons donc pu recréer un réseau unidirectionnel avec des zones de projections structurelles et fonctionnelles spécifiques.

### *Réorganisation topographique dans une condition d'hyperactivité neuronale*

En introduisant une mutation dans le canal Kir2.1, provoquant une hyperexcitabilité neuronale, anomalie couramment observée dans des maladies neurodéveloppementales telles que l'autisme, la schizophrénie ou le trouble bipolaire (Sicca et al. 2011; Imbrici, Camerino, et Tricarico 2013; Ambrosini et al. 2014; Binda et al. 2018), nous avons observé une réorganisation profonde du circuit corticostriatal. L'hyperactivité corticale a conduit à une augmentation de la densité des projections dans la chambre striatale, ainsi qu'à l'invasion de la zone de non-recouvrement. Bien que l'activité individuelle des neurones reste inchangée, l'hyperactivité a engendré des nœuds de convergence dysfonctionnels, perturbant l'organisation topographique normale des projections et modifiant le réseau par la perte de son caractère ségrégé. Ce modèle offre des informations précieuses sur la façon dont les déséquilibres d'excitabilité neuronale, peuvent entraîner une désorganisation des réseaux cérébraux. L'efficacité de la plateforme microfluidique pour recréer des réseaux neuronaux à petite échelle nous a permis une observation en temps réel de la dynamique des circuits. Notre modèle permet ainsi de simuler les perturbations génétiques ou environnementales dans des réseaux complexes et de les étudier à plusieurs échelles, des connexions au réseau entier. Ces résultats ouvrent des perspectives pour des applications futures dans le développement de nouvelles thérapies, en particulier pour les maladies neurodéveloppementales où la connectivité cérébrale est altérée. Cette approche minimaliste pourrait compléter les modèles *in vivo*, permettant une analyse plus détaillée des réorganisations des circuits neuronaux.

### *Potentiel de la plateforme pour le développement de traitements thérapeutiques*

Nos résultats démontrent qu'une plateforme *in vitro* de type cerveau-sur-puce, simple d'utilisation, peut offrir des informations cruciales sur les mécanismes de réorganisation des

réseaux neuronaux, tout en ouvrant des perspectives pour des stratégies thérapeutiques ciblant les désordres du connectome. Cette approche permet d'observer en détail les dynamiques de connectivité neuronale et leur évolution au sein d'un microenvironnement contrôlé, en réponse à l'application ciblée de traitements sur différentes populations cellulaires. Intégrer cette méthode précocement dans le processus de développement thérapeutique pourrait améliorer la compréhension des effets et de l'efficacité des traitements avant leur évaluation *in vivo*.

Cependant, bien que les plateformes cerveau-sur-puce offrent des résultats robustes et reproductibles, leur manipulation individuelle, lente et non standardisée, limite leur optimisation à grande échelle. Pour surmonter ces limitations, nous présentons dans l'étude suivante le développement d'une plateforme de distribution microfluidique destinée à multiplexer et automatiser les expérimentations sur le modèle cerveau-sur-puce de cette étude. Cette plateforme a pour objectif de standardiser les procédures et d'améliorer la reproductibilité des résultats, tout en augmentant le volume de données produites, ce qui est essentiel pour répondre aux exigences de l'industrie pharmaceutique.

# 6 Étude 2 : Introduction

Comme discuté dans **le chapitre 2.6.2**, la démocratisation des organes-sur-puces réside dans le développement de plateformes standardisées, automatisées et faciles d'utilisation. Ces dix dernières années, une multitude de systèmes de distribution microfluidique académiques et commerciaux pour organes-sur-puces ont vu le jour, tous avec des niveaux d'intégration et de multiplexage grandissants. Néanmoins, les systèmes s'intéressant spécifiquement aux cerveaux-sur-puces sont rares et les autres, en imposant une architecture de puce, sont peu versatiles et ne permettent pas d'adresser des organes-sur-puces et des questions biologiques diverses. De plus, peu des systèmes existants se proposent d'être compatibles avec les systèmes d'analyse déjà présents dans les laboratoires et les industries. Ainsi, nous avons dirigé nos efforts vers le développement d'une plateforme de distribution microfluidique automatique, compatible avec les systèmes d'analyse existants et versatile pour adresser un ensemble d'architectures de puce et de questions biologiques. Ainsi dans cette étude réalisée en partenariat avec l'entreprise Fluigent dans le cadre d'une thèse CIFRE nous avons développé et testé un prototype de machine de distribution microfluidique appelé **MAARS (Multi-acquisition Autonomous & Rapid Screening System)** qui a fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet en novembre 2023. Je tiens à remercier particulièrement l'ensemble de l'équipe Fluigent, notamment William César, pour son encadrement et son aide sur l'ensemble du développement, Julie Maurin, pour son implication dans la conception mécanique du modèle de distribution, ainsi que Louis Da Costa pour son aide dans la conception mécanique de la station fluidique.

Dans cette étude, nous définissons d'abord les spécifications de la machine en réalisant un état de l'art des plateformes existantes en cernant les attentes d'acteurs du milieu microfluidique et organes-sur-puces. Nous détaillons ensuite le développement du prototype et nous exemplifions son fonctionnement dans le cadre d'un multi-immunomarquage sur culture neuronale dans la puce multiplexée présentée dans l'étude 1. Enfin, nous abordons les développements futurs et les améliorations envisagées pour un second prototype qui pourrait évoluer vers une potentielle industrialisation.

# 7 Systèmes translationnels pour organes-sur-puces

Les organes-sur-puces ayant le potentiel d'améliorer l'efficacité et la pertinence physiologiques des résultats dans la découverte de mécanismes biologiques complexes et dans le développement médicamenteux, il est nécessaire de s'intéresser aux challenges cruciaux qui permettront leur démocratisation. Pour ce faire, de nombreux acteurs ont émergé pour identifier les besoins et les développements technologiques nécessaires à cette translation. *Allwardt et al.* (Allwardt et al. 2020) récapitulent dans leur étude 140 interviews de différents acteurs (développeurs et utilisateurs) d'organes-sur-puces afin de cartographier les développements futurs nécessaires. Ils ont pu mettre en évidence que les utilisateurs finaux cherchent des plateformes peu coûteuses, qui permettent d'obtenir des résultats robustes, reproductibles et fiables (3R : robustness, reproducibility, reliability) et une perfusion automatique des fluides (Figure n°30 A). Néanmoins, les produits et services actuellement disponibles commercialement se concentrent sur l'aspect multiplexé, capital pour le développement médicamenteux et le besoin en criblage nécessaire aux études biologiques n'adressent que peu la perfusion automatique, le contrôle de la plateforme par une interface informatique et le contrôle spécifique de l'environnement (Figure n°30 B).

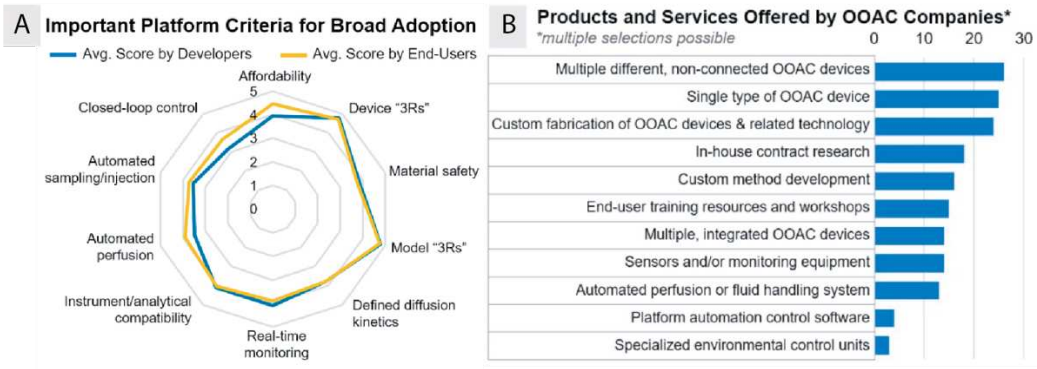



*Figure 30 État des lieux des caractéristiques attendues des plateformes organes-sur-puces (OOAC : Organ-on-a-chip). (A) Quantification de l'importance des caractéristiques d'une plateforme organe-sur-puce pour les utilisateurs, en jaune (0 : pas du tout important, 5 : extrêmement important). (B) État des lieux des produits et services offerts par les entreprises du secteur organe-sur-puce. Adapté de Allwardt et al.*

En plus de cette étude publiée et de nos propres besoins en tant que end-user d'un laboratoire de recherche académique, nous avons, de notre côté, conduit trois interviews supplémentaires auprès d'acteurs évoluant dans le secteur des organes-sur-puce à différents niveaux : Sophie Millet, Directrice adjointe du service des études bibliométriques et marketing dans les secteurs de la santé et des sciences de la vie au CEA. Elle a dirigé l'étude de marché pour ORCHID (Organ-on-chip en développement) en 2018 (Mastrangeli et al. 2019). Duc Phan, responsable de projet pharmacocinétique et métabolisme chez Pfizer. Pendant son doctorat, Duc Phan a développé plusieurs plateformes microfluidiques pour des micro-organes vascularisés (Phan et al. 2017). Il a co-créé une start-up basée sur ces plateformes, Aracari Biosciences. Massimo Mastrangelli, professeur assistant à l'Université de Delft, spécialisé dans les technologies des organes-sur-puce. Il explore la conception et la fabrication de plateformes organes-sur-puce innovantes, la « Smart Organ on Chip », qui est une plateforme modulable standardisée avec du micropompage pour la perfusion automatique, prévue pour 2026.
Nous les avons interrogés sur les caractéristiques cruciales des plateformes organes-sur-puce (pour la liste des questions et des réponses détaillées, voir le tableau dans les annexes). Tous les experts s'accordent sur l'importance du multiplexage des puces pour le criblage à haut débit dans le domaine des organes-sur-puce. Pour eux, les plateformes organes-sur-puce doivent au moins pouvoir avoir un « débit relatif » (8 à 12 organes-sur-puce simultanés). En lien avec les difficultés à trouver un bon modèle *in vivo*, tous les experts interrogés ont souligné le rôle des plateformes organe-sur-puce dans la phase de « Lead optimisation », comme abordé dans le **chapitre 2.6.1**, lors de la découverte de médicaments. L'automatisation de la distribution fluidique apparaît pour eux comme un élément central pour garantir l'obtention de résultats reproductibles et robustes. De plus, l'automatisation permettra d'augmenter la facilité d'utilisation et de réduire la formation du personnel utilisant les plateformes, facilitant ainsi le transfert de la plateforme dans d'autres laboratoires et dans l'industrie pharmaceutique. Enfin, nous les avons interrogés sur le caractère versatile d'une plateforme microfluidique, défini comme la capacité d'une plateforme à être utilisée pour différentes architectures d'organes-sur-puce et types cellulaires. Pour eux, une plateforme versatile est considérée comme très importante. Ils s'accordent à dire qu'il ne peut pas exister une unique plateforme pour toutes les applications (organes-sur-puce 2D, 3D, etc.), mais plus une plateforme est versatile dans son champ d'application, plus elle permettra la démocratisation de la technologie organe-sur-puce.

## 7.1 Systèmes commerciaux existant

Plusieurs entreprises proposent déjà des plateformes organes-sur-puce, adressant un certain nombre des caractéristiques évoquées précédemment. Parmi elles, nous en présentons succinctement trois qui répondent à un maximum de critères cruciaux. Tout d'abord, Mimetas a développé une plaque d'organes-sur-puce parallélisée avec les dimensions d'une plaque 96 puits, Organoplate™, où 40 à 64 répétitions d'un même organe-sur-puce sont présentes. La plaque présente quatre designs de puces différents pour gagner en versatilité et adresser différentes applications (Figure n°31 A,B). Elle a été utilisée dans la modélisation de la puce de neurites en 3D de progéniteurs de neurones moteurs iPSC (Spijkers et al. 2021) ou dans la modélisation multiplexée de la barrière hémato-encéphalique (Wevers et al. 2016).

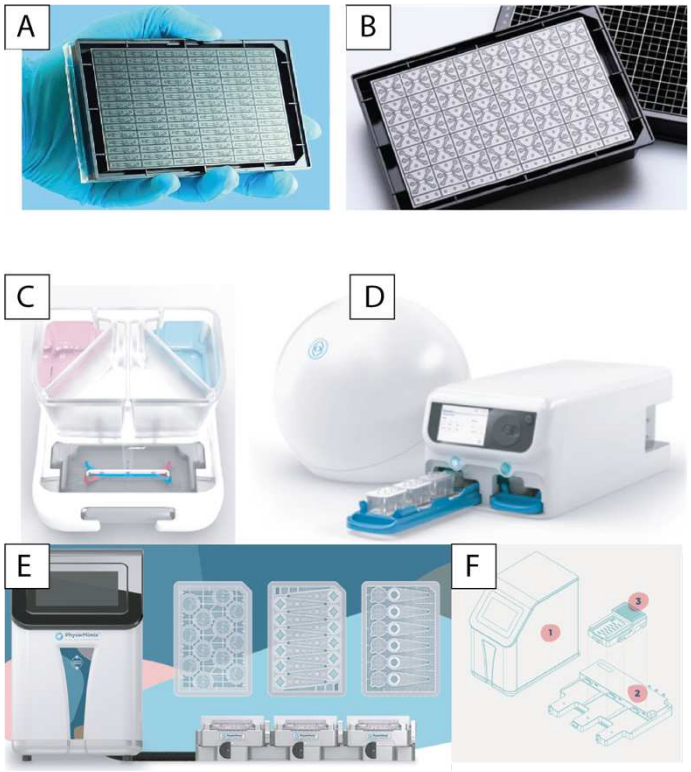



*Figure 31 Différentes plateformes pour organes-sur-puces commerciales. Différents designs de plaque OrganoPlate™ de Mimetas : (A) 96 puces à double compartiment, (B) 40 puces à trois compartiments. Zoë-CM2™ d'Emulate : (C) holder avec réservoir de perfusion pour une puce, (D) machine de stockage et de perfusion des puces avec le système de contrôle. Système PhysioMimix™ de CN-BIO avec (E) une vue générale de la machine et des trois designs de puces disponibles, (F) un schéma du système avec 1-la station de contrôle, 2-la plateforme d'amarrage pour la perfusion, 3-les holders de distribution de la perfusion.*

Néanmoins, même si la plaque est parallélisée et compatible avec les microscopes déjà existants, il n'y a pas de contrôle quantitativement monitoré. Emulate propose un design de puce microfluidique figé, mais utilisé avec différents types cellulaires (Ewart et al. 2022). Ils ont développé une plateforme de culture automatisée, la Zoé-CM2™, qui permet jusqu'à douze modèles de leur puce d'être perfusés automatiquement, le tout géré par logiciel. Néanmoins, chaque puce doit être montée sur un dispositif individuel, et la plateforme doit fonctionner en partenariat avec une unité extérieure, l'Orb™, pour le contrôle de la perfusion (Figure n°31 C,D). Ainsi, elle est peu compatible avec les systèmes d'analyse des laboratoires et permet uniquement la perfusion de milieu pour la culture, et non pour des analyses en temps réel. Enfin, la plateforme PhysioMimixTM de CN-BIO permet la perfusion automatisée jusqu'à 44 sphéroïdes 3D (Kostrzewski et al. 2021) sur leurs plaques propriétaires organes-sur-puce. Elle propose un système en trois parties : une station de contrôle, une plateforme pour la perfusion des fluides et un support pour leur plaque. Les plaques avec les cellules peuvent être déconnectées du système pour conduire des analyses sur les systèmes déjà présents dans les laboratoires. Toutefois, elle ne s'adresse qu'aux cultures 3D de foies-sur-puce, limitant ainsi ses applications (Figure n°31 E,F).

Pour résumer, la démocratisation de la technologie organes-sur-puces sera facilitée par le développement de plateformes microfluidiques robustes. Il est évident qu'il n'existera pas une unique plateforme ; néanmoins, malgré les plateformes disponibles commercialement, il manque une plateforme qui permette d'adresser les cinq caractéristiques critiques identifiées par les acteurs du milieu :

- Parallélisé, pour augmenter le débit de criblage.
- Facilité d'utilisation, par l'automatisation des processus.
- Compatibilité, avec les systèmes d'analyse déjà existants.
- Versatilité, pour répondre à différentes questions biologiques et adresser différents organes-sur-puce.

En partenariat avec Fluigent, dans le cadre de ma thèse CIFRE, nous avons développé un prototype de plateforme de distribution microfluidique répondant à ces caractéristiques.

## 7.2 Caractéristiques de la plateforme MAARS

Le système **MAARS (Multi-acquisition Autonomous & Rapid Screening System)** que nous avons développé vise à être une plateforme permettant la perfusion parallélisée de multi-

organes-sur-puces, versatile dans son adressage et adaptée aux dispositifs optiques déjà existants. Il permet la distribution et le criblage de manière séquentielle ou simultanée de différentes solutions et molécules, avec une grande robustesse et interopérabilité pour maximiser la facilité d'utilisation et la reproductibilité des résultats. La perfusion peut être continue et elle est rétrocontrôlée en débit grâce à un débitmètre. Enfin, cette plateforme maximise la compacité et ses éléments sont détachables les uns des autres pour faciliter son utilisation dans différents contextes.

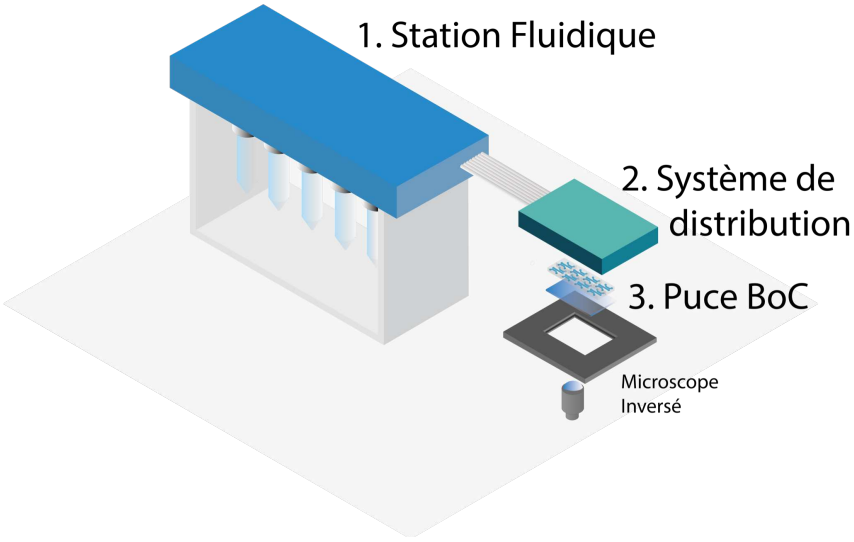



*Figure 32 Schéma représentatif de la plateforme MAARS*

Le système développé est composé de 3 sous-ensembles (Figure n°32) :

1- Une station fluidique, permettant le stockage et la mise sous pression (pour le contrôle du débit) de différentes solutions, prêtes à être distribuées par le module de distribution fluidique dans les puces. Elle contient tous les éléments permettant le contrôle, ainsi que le contrôle des pressions d'actuation des microvalves pneumatiques présente dans le module de distribution (nous détaillerons ces microvalves dans le chapitre 8.2) de mise sous pression des fluides et de distribution pneumatique.
2- 2- Un module de distribution microfluidique avec une architecture de distribution adaptée au design de la puce multiplexée à adresser. C'est un dispositif extrêmement compact qui contient tous les éléments

nécessaires pour assurer la distribution des solutions dans les compartiments des puces souhaités par l'utilisateur.

3- 3- L'organe-sur-puce multiplexé. Dans notre cas, nous avons multiplexé la puce de l'étude 1 pour réaliser un multi-cerveau-sur-puce destiné à l'étude du réseau cortico-striatal.

Le module de distribution est assemblé avec la puce multiplexée sur un support compatible avec les microscopes inversés, doté d'un système d'incubation permettant la réalisation de perfusions et l'observation en temps réel des tissus en culture. Connecté à la station fluidique, le système de distribution peut délivrer jusqu'à huit solutions différentes dans les différents compartiments de la puce multiplexée, de manière séquentielle ou simultanée. Avant de détailler des cas d'usage précis et un exemple concret de l'utilisation de la plateforme MAARS, il faut s'intéresser à la conception du prototype. Nous commencerons par le design de la puce multiplexée et son interconnexion avec le système de distribution. Nous continuerons avec le design et la fabrication du système de distribution, ainsi que les tests réalisés pour le valider. Nous préciserons ensuite la stratégie imaginée pour gagner en versatilité sur le système. Enfin, nous nous intéresserons à la mise en place de la station fluidique.

# 8 Développement du prototype MAARS

## 8.1 Multiplexage de la puce et interconnexion avec le système de distribution

L'objectif premier du système MAARS est d'être une plateforme qui permet la perfusion d'une puce multiplexée. Pour ce faire, il nous faut donc d'abord développer la puce multiplexée, et conformément aux objectifs d'automatisation de la distribution fluidique et de versatilité, il faut mettre en place une stratégie qui permette de connecter différents designs de puces au module de distribution fluidique (que nous détaillerons dans le sous-chapitre suivant) (Figure 33 A, B). Pour développer l'aspect de multiplexage, nous devons donc respecter deux spécifications majeures. Premièrement, pour être compatible avec l'environnement des microscopes, la puce multiplexée et son interconnexion ne peuvent pas dépasser les dimensions d'une plaque 96 puits (124 mm x 84 mm) afin d'être compatibles avec les holders

commercialement disponibles. Deuxièmement, le module de distribution doit adresser le plus grand nombre de designs de puce.

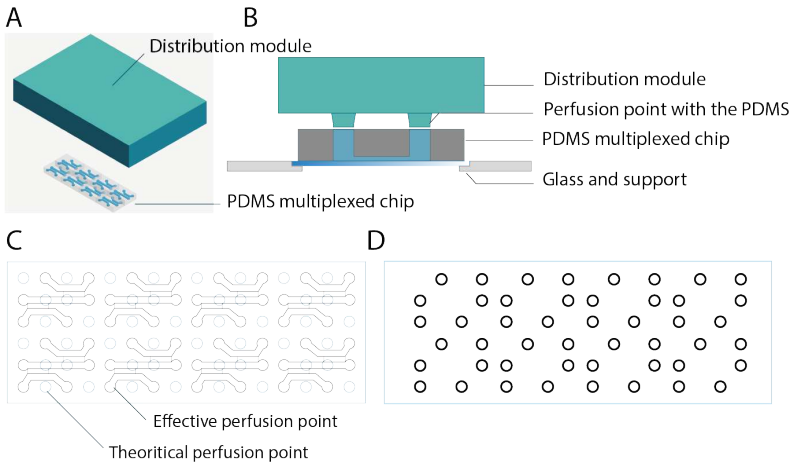



*Figure 33 Schéma de la stratégie d'interconnexion avec la puce multiplexée. (A), (B) Schéma de connexion entre la puce et le système de distribution, assuré par des excroissances coniques du système de distribution qui s'enfoncent dans le PDMS. (C) Matrice théorique superposée à la puce multiplexée et (D) matrice effective une fois les points de perfusion fluidique validés.*

Pour cela, nous avons conçu une matrice de points de perfusion fluidique (Figure n°33 C,D) sur laquelle plusieurs designs peuvent s'adapter. Nous avons délibérément choisi de maximiser le nombre de points coniques de perfusion en réduisant leur diamètre à 1,5 mm, avec un espacement de 3 mm (ISO 22916:2022). Il n'était pas possible de réduire davantage le diamètre des cônes de perfusion car, en microfluidique, le tubing de diamètre 1/16'' représente l'une des plus petites dimensions standard des connecteurs. De plus, nous ne pouvions pas rapprocher davantage les cônes de perfusion sans augmenter considérablement le coût d'usinage du prototype. Conformément à l'avis des experts présenté précédemment, nous avons décidé de multiplier par 8 la puce de l'étude 1, afin de respecter le critère minimal de multiplexage tout en évitant de concevoir un prototype trop complexe. Avec huit répétitions, la taille de la puce multiplexée est de 54 mm x 24 mm. Ainsi, en utilisant les dimensions d'une plaque à 96 puits, nous pouvons intégrer au minimum deux répétitions de 8 motifs, portant la capacité de la puce multiplexée à un minimum de douze dans une version future.

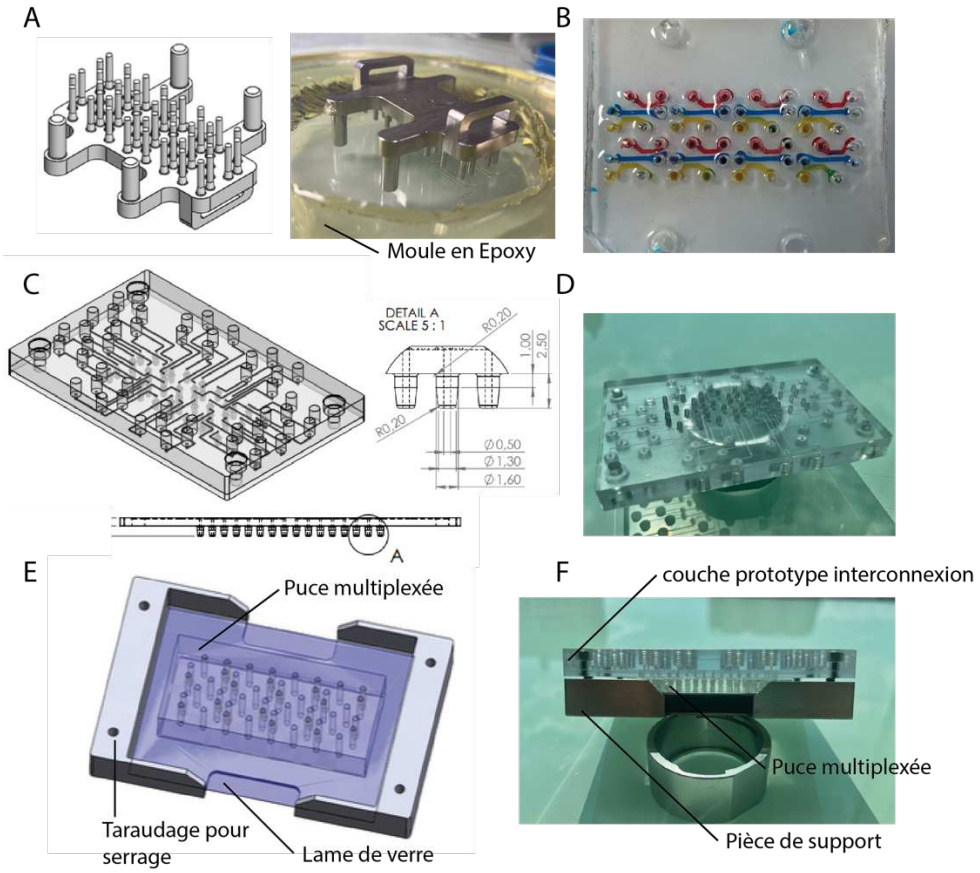



*Figure 34 interconnexion entre la puce PDMS et la couche d'interconnexion. (A) Pièce de prépunch en aluminium pour assurer la position et le diamètre des puits d'entrée et de sortie de la puce en PDMS. (B) PDMS multiplexée avec positions des puits et colorant dans les chambres pour visualiser le design. (C) Dessin technique de la couche d'interconnexion prototype et détail des cônes de perfusion. (D) Couche d'interconnexion en polycarbonate. (E) Schéma de la pièce support compatible avec les holders microscope, avec la puce multiplexée et la lame de verre. (F) Assemblage et serrage de la couche d'interconnexion sur la puce multiplexée pour l'étanchéité.*

La plus grande difficulté technique du développement de cette matrice d'interconnexion est d'assurer l'étanchéité fluidique entre le module de distribution et la puce en PDMS. Nous avons fait le choix de compter sur le caractère élastique de la déformation du PDMS pour assurer l'étanchéité lors de la déformation des cônes de perfusion fluidique. Pour contrôler le diamètre des puits d'accès dans la puce en PDMS, nous avons conçu une pièce en aluminium appelée "prépunch", permettant de standardiser à la fois la position et le diamètre des puits (Figure n°34 A, B) dans la puce multiplexée. Cette pièce s'insère dans le moule, avec un système de détrompeur, avant la polymérisation du PDMS et est retirée une fois le PDMS polymérisé, laissant ainsi l'empreinte des puits parfaitement positionnée et calibrée. La puce multiplexée a pu ensuite être montée sur un support en aluminium et connectée à une pièce prototype de l'interconnexion (Figure n°34 C,D,E). L'étanchéité était créée par pression mécanique en serrant de manière homogène des vis (Figure n°34 F). L'étanchéité n'est garantie que lorsque

le serrage est maximal et que l'épaisseur du PDMS dépasse 10 mm. Sur notre pièce support, lors du serrage, l'effort est absorbé par la lame de verre de 0,170 mm, qui se casse très facilement sous la pression. Il est donc nécessaire de trouver une solution alternative pour garantir l'étanchéité et éviter toute brisure de la lame de verre. Nous discuterons à la fin du chapitre des améliorations possibles à envisager pour résoudre ce problème. La couche prototype d'interconnexion développée ici, malgré son défaut potentiel de briser la lame de verre, est validée et a été intégrée dans le module de distribution.

## 8.2 Développement du système de distribution microfluidique

En parallèle du développement de l'interconnexion, nous avons développé le prototype du module de distribution. Ce module fluidique représente le challenge technologique principal de la plateforme MAARS. En effet, il est l'interface compacte et versatile qui permet la distribution fluidique de chaque solution dans chaque compartiment de la puce multiplexée. Il doit être le plus compact possible pour s'adapter aux environnements de microscope et de minimiser les chemins fluidiques. L'ensemble du dispositif doit également être conçu pour être industrialisable, avec une attention particulière portée à la réduction des coûts. Pour ce faire, il prendra la forme d'un assemblage de plusieurs couches. Tout en bas, la couche d'interconnexion avec la puce, suivie de la couche fluidique qui connecte la couche d'interconnexion, permettant de faire circuler les solutions dans les compartiments de la puce en dessous. Juste au-dessus de la couche fluidique, nous retrouvons la membrane déformable, qui est actionnée dans les microvalves pneumatiques pour le contrôle du passage fluidique. Enfin, au-dessus de la membrane, la couche pneumatique assure la mise en pression des microvalves (Figure n°35).

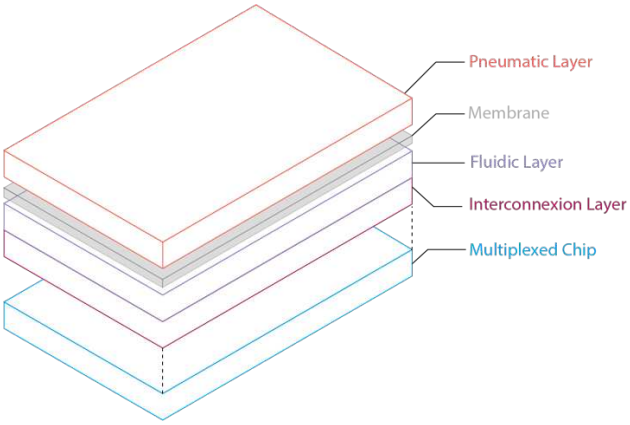



*Figure 35 Schéma simplifié des différentes couches du module de distribution et de la puce multiplexée. Les connexions vers la station fluidique ne sont volontairement pas représentées ici, elles seront détaillées plus loin dans le chapitre.*

Nous détaillerons, dans l'ordre, le prototypage des microvalves pour le passage ou non des fluides dans la couche fluidique. L'architecture de la couche fluidique et sa versatilité, ainsi que l'architecture de la couche pneumatique avec la stratégie adoptée pour la réduction des adressages pneumatiques.

### 8.2.1 Caractérisation des micro-valves

Dans le module de distribution MAARS, nous voulons être capables non seulement d'assurer un débit maîtrisé entre 10 et 200 µL/min dans chacun des canaux, mais surtout d'être capables de l'arrêter sur commande ou d'autoriser son passage à des endroits désirés. Pour ce faire, nous avons développé des microvalves capables, sur commande, de se fermer et d'interrompre le débit, et inversement. Il existe à l'échelle microfluidique plusieurs composants, tels que des micropompes et des microvalves, qui peuvent être directement installés dans les dispositifs microfluidiques le long des canaux pour contrôler les débits fluidiques (Qian et al. 2020). Pour la plateforme MAARS, notre intérêt porte sur l'intégration de microvalves. Les microvalves sont des éléments de commutation fluidique, permettant la modulation ou l'arrêt/passage du (Zhao et al. 2023; Kasturi et al. 2021). La fonction des microvalves dépend de leur structure, qui est liée à leurs mécanismes d'actionnement (Qian et al. 2020; Qian et al. 2019). Une microvalve se divise en deux catégories : les microvalves actives et les microvalves passives. Les microvalves actives peuvent être contrôlées par des forces mécaniques ou électriques, tandis que les microvalves passives utilisent généralement les propriétés intrinsèques du fluide qui y circule, comme sa température (Debray et al. 2007)

ou son débit (Yang, Wang, et Schomburg 2010), pour modifier leur état d'ouverture. Pour le système de distribution de la plateforme MAARS, nous voulions contrôler de manière précise et rapide l'ouverture et la fermeture des microvalves afin d'autoriser ou non le passage d'une solution dans un canal donné pour perfuser un compartiment de la puce multiplexée.

Ainsi, nous nous sommes intéressés aux microvalves actives. Pour les microvalves actives, il existe différents types d'actionneurs. Tout d'abord, nous pouvons mentionner les actionneurs à mouvement mécanique d'une « porte » coulissante qui ouvre ou ferme la microvalve (Venzac et al. 2020) (Figure n°36 A), ou les vannes à pincement, où une membrane flexible est déformée par un élément mécanique pour fermer le canal de circulation fluidique (Figure n°36 C) (Browne 2008). On peut également parler de l'actionnement par effet électrostatique, qui permet la fermeture de la microvalve grâce à des électrodes et une membrane flexible (Anjewierden, Liddiard, et Gale 2012) (Figure n°36 D), ou par force magnétique (Casals-Terré et al. 2008; Gholizadeh et Javanmard 2016) (Figure n°36 B).

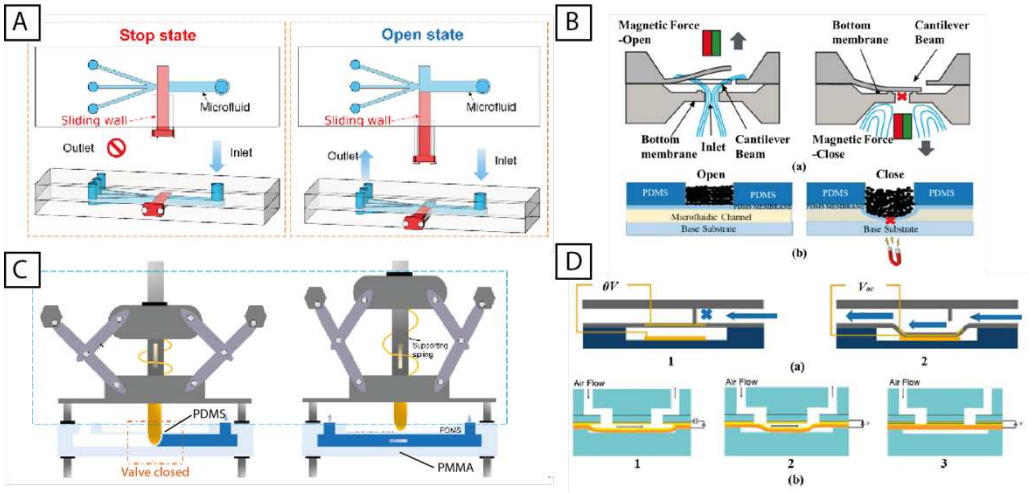
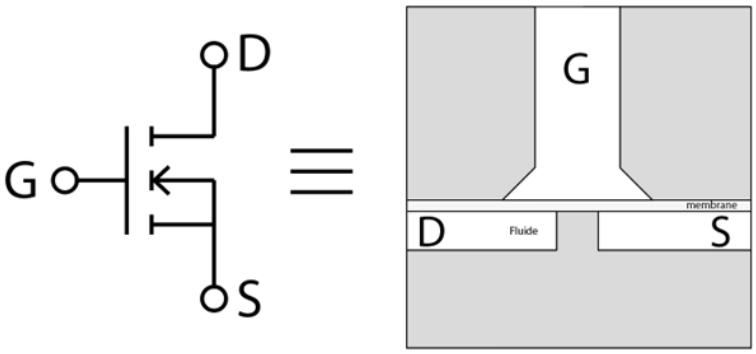



*Figure 36 Différentes technologies de microvalves actives. (A) « Porte coulissante ». (B) Utilisation de la force magnétique pour l'ouverture ou la fermeture de la vanne. (C) Valve à pincement avec membrane déformable. (D) Membrane utilisant la force électrostatique pour sa fermeture et ouverture (30 Qian).*

Néanmoins, pour le système de distribution MAARS, nous étions contraints de le rendre le plus compact possible afin qu'il puisse s'intégrer dans une enceinte de microscope inversé. Ces systèmes d'actionnement complexes ne permettent pas de réaliser des microvalves extrêmement compactes. Il existe toutefois un autre moyen d'actionnement des microvalves : l'actionnement pneumatique.Les microvalves à actionneurs pneumatiques ont un très bon

rapport poids-puissance (Shinichi Hirai and Kazuhiro Kato, 2015) ce qui leur permet d'être compactes sans perdre d'efficacité. Elles sont composées d'une membrane déformable qui permet d'autoriser ou non le passage de fluide sous une action pneumatique. On pourrait comparer le fonctionnement de ces vannes à celui d'un transistor MOSFET. Dans ces transistors, le courant va du drain (D) à la source (S). Par analogie, dans les microvalves, le courant est représenté par le débit fluidique qui va de sa source (D) à sa destination (S) (Figure n°37). La porte (G) sert, en fonction d'une tension appliquée, à autoriser ou non le passage du courant ; de même, dans les microvalves, l'application d'une pression pneumatique positive ou négative pilote la déformation de la membrane pour autoriser ou non le passage du fluide. Dans les transistors, il existe une tension seuil à appliquer pour que le courant commence à circuler ; dans les microvalves pneumatiques, le seuil de pression est déterminé par plusieurs facteurs décisifs. Il est défini par la taille de la microvalve, ainsi que par l'épaisseur et le matériau de sa membrane (Lau et al. 2014).



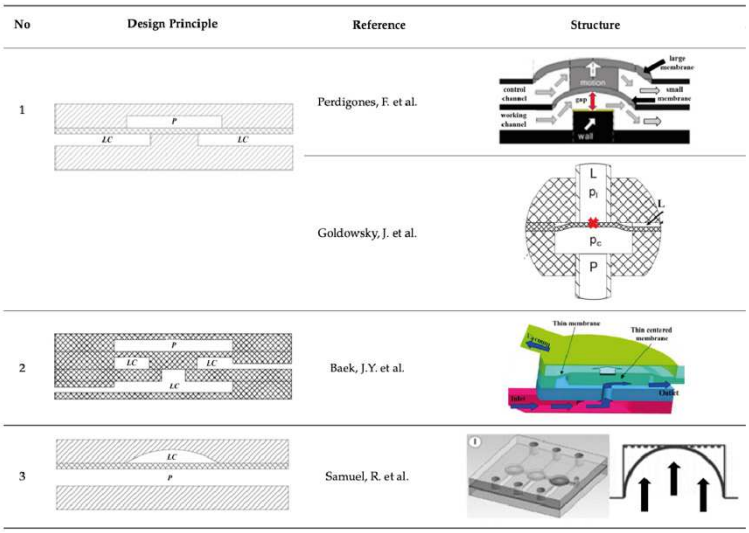



*Figure 37 Technologies de microvalves à membrane déformable. (Haut) « Équivalence » entre transistor MOSFET et vanne pneumatique à membrane déformable. (Bas) Tableau des différents designs de microvalves pneumatiques (LC correspond à Liquid Canal, et P à Pressure Canal) avec des canaux rectangulaires : 1- Les designs les plus compacts (ref 75, 74 Qian), 2- Les plus complexes (76 Qian), et 3- Le plus simple, mais avec un canal semi-circulaire (77 Qian).*

L'équivalence reste toutefois limitée. Dans le cas d'un transistor MOSFET, appliquer une tension de drain (D) supérieure à la recommandation du constructeur va simplement endommager et détruire le transistor. Dans le cas de la vanne, si la pression fluidique appliquée en D est nettement supérieure à la pression en G, la membrane sera déformée sous l'action de la poussée du fluide et ouvrira la vanne malgré la pression appliquée pour la maintenir fermée. De plus, dans la caractérisation des microvalves, une attention particulière doit être portée au choix de la membrane déformable afin d'assurer une déformation constante sur un grand nombre de cycles d'ouverture/fermeture. Il existe trois designs majeurs de microvalves pneumatiques que nous détaillons dans la figure n°37 adaptée de *Qian et al*. (Qian et al. 2020) Un design simple est obtenu par deux canaux perpendiculaires l'un sur l'autre. L'un des deux canaux est pressurisé pour fermer l'autre (Figure n°37 n°3). Néanmoins, ce type de microvalve utilise un canal fluidique semi-elliptique ou arrondi, ce qui représente un défi lors de la microfabrication lorsque ce canal a des dimensions micrométriques. Ainsi, des valves plus complexes ont été développées, mais elles nécessitent des couches de matériaux supplémentaires (Figure n°37 n°2). Enfin, des designs réduisant la complexité et le nombre de couches nécessaires à la réalisation de la microvalve ont été publiés (Figure n°37 n°1). C'est sur le principe de ces derniers designs que nous avons développé les microvalves du système MAARS afin de limiter l'épaisseur du module de distribution, sa complexité, et d'augmenter sa compacité.

Le choix de la membrane déformable dans les microvalves constitue un paramètre essentiel pour leur bon fonctionnement. Nous souhaitons réaliser un module de distribution compact avec un grand nombre de microvalves pour le contrôle fluidique. Il est donc nécessaire de trouver un matériau qui soit à la fois déformable sous quelques centaines de mbar et suffisamment fin pour garantir la compacité du module. Dans le domaine académique, le PDMS est largement utilisé pour la création de membranes fines et déformables grâce à la méthode du spin-coating. Il a déjà été employé pour la fabrication de valves et de chambres activées pneumatiquement (Thorsen, Maerkl, et Quake 2002; Jensen, Bhat, et Mathies 2010). Cependant, comme nous l'avons vu, le PDMS peut absorber certaines molécules et n'est pas compatible avec les solvants, ce qui le rend inadapté pour un module de distribution à vocation industrielle. Un autre matériau, l'Ecoflex™, permet la création de membranes extrêmement déformables, pouvant atteindre 980 % d'allongement avant rupture. Il a également été utilisé pour la création de cartes microfluidiques avec des valves pneumatiques (Pineda, 2015). Toutefois, l'Ecoflex n'est pas transparent, ce qui le rend inadapté à notre module de distribution, qui doit s'intégrer dans des environnements de microscope. De plus, son scellage entre différentes couches nécessite des adhésifs spéciaux, augmentant ainsi son coût et sa difficulté d'industrialisation.

Il existe un autre silicone, le Polysil S1001, qui est un silicone adhésif, déformable, transparent, résistant et non absorbant. Étant donné son caractère adhésif, il est fourni avec deux couches de liner pour empêcher son adhérence, ce qui permet de l'utiliser comme membrane déformable dans des applications de microvalves. Nous avons décidé d'utiliser ce silicone pour les microvalves du système de distribution MAARS.

| épaisseur membrane ep (en mm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,1 | | 0,15 | | 0,2 | |
| DC (en mm) | TV (en mm) | DC | TV | DC | TV |
| 0,25 | 0,5 | 0,25 | 0,5 | 0,25 | 0,5 |
| 0,3 | 0,8 | 0,3 | 0,8 | 0,3 | 0,8 |
| 0,5 | 1 | 0,5 | 1 | 0,5 | 1 |

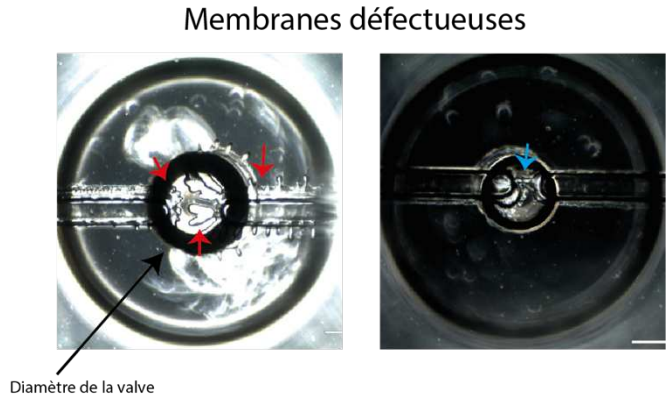



*Figure 38 Différentes géométries de membranes testées. Le code couleur représente les membranes que nous avons réussi à ouvrir et fermer sur la plage de pression de -800 à +1000 mbar : en jaune, seulement une membrane sur deux et de manière inconstante ; en rouge, les membranes que nous n'avons jamais pu piloter. Défauts de membrane : impossibilité d'ouverture, déformation de la membrane (flèches rouges) ; membrane fonctionnelle mais qui ne s'ouvre pas correctement, avec seulement un petit canal autorisant le passage du fluide (flèche bleue).*

Nous souhaitons développer des microvalves avec un diamètre inférieur à 1 mm et une compacité verticale optimisée pour réduire la taille du module de distribution MAARS, permettant ainsi d'installer un grand nombre de valves dans le module pour différentes applications. De plus, ces microvalves doivent pouvoir être contrôlées via des pompes de laboratoire standard, sur une échelle de pression de -1000 à +1000 mbar, afin de simplifier l'intégration de la plateforme aux équipements existants. Dans cette optique, nous avons prototypé un module de test en variant plusieurs paramètres : la taille de la vanne (TV), correspondant au diamètre de la vanne ; la distance intercanaux (DC), qui représente l'écart entre deux segments de canal fluidique et qui bloque le flux ; ainsi que l'épaisseur de la membrane (Ep) (Figure n°38). Le tableau présente les différentes dimensions des prototypes testés, exprimées en millimètres.

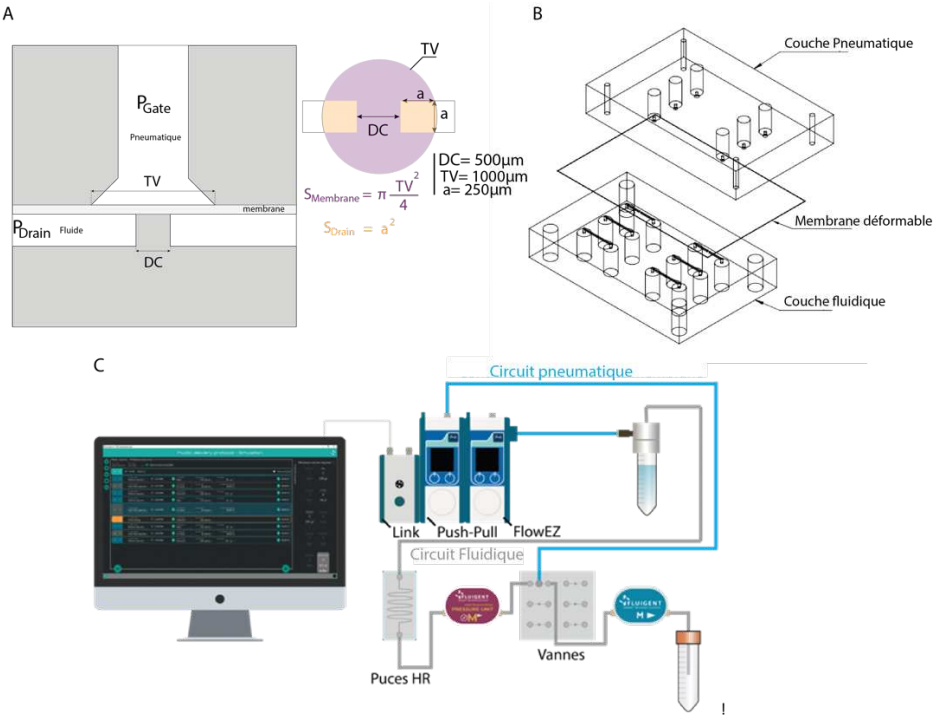



*Figure 39 Tests de microvalve du module de distribution MAARS. (A) Géométrie des microvalves. (B) Module de test décomposé avec les 3 couches. (C) Installation pour tester les microvalves.*

Ce module était composé de deux répétitions de trois géométries de valves différentes afin de trouver la configuration la plus adaptée. En effet, étant donné les dimensions extrêmement petites des vannes et l'épaisseur réduite de la membrane, nous n'étions pas certains de pouvoir contrôler l'ouverture et la fermeture des microvalves de manière systématique. Après 50 répétitions d'ouvertures et de fermetures, nous n'avons jamais réussi à contrôler les microvalves avec une membrane d'une épaisseur de 200 µm. En revanche, pour les membranes de 150 µm d'épaisseur, celles ayant une distance intercanaux de 500 µm et un diamètre de microvalve de 1000 µm étaient contrôlables de manière systématique. De même, nous pouvions contrôler systématiquement l'ouverture et la fermeture des microvalves avec une membrane d'une épaisseur de 100 µm, sauf pour les microvalves de 1000 µm de diamètre, où la membrane s'est déchirée après quelques cycles. Par conséquent, pour réduire le risque de déchirement de la membrane, nous avons décidé de valider les microvalves **de 1000 µm de diamètre, avec une distance intercanaux de 500 µm et une épaisseur de membrane de 150 µm** (Figure n°39 A).

Nous avons ainsi prototypé un deuxième module composé de 6 répétitions de cette géométrie de valves afin de procéder à des tests visant à caractériser les débits atteignables (Figure n°39 B), les pressions d'ouverture et de fermeture ainsi que l'évolution de la membrane sur un grand nombre de cycles d'ouverture et de fermeture. Pour ce faire, nous avons monté un banc de

test composé d'un FlowEZ™ relié à un débitmètre pour le contrôle du fluide, et d'un PushPull pour faire varier la pression appliquée sur la membrane (de -800 à +1000 mbar) (Figure n°39 C).

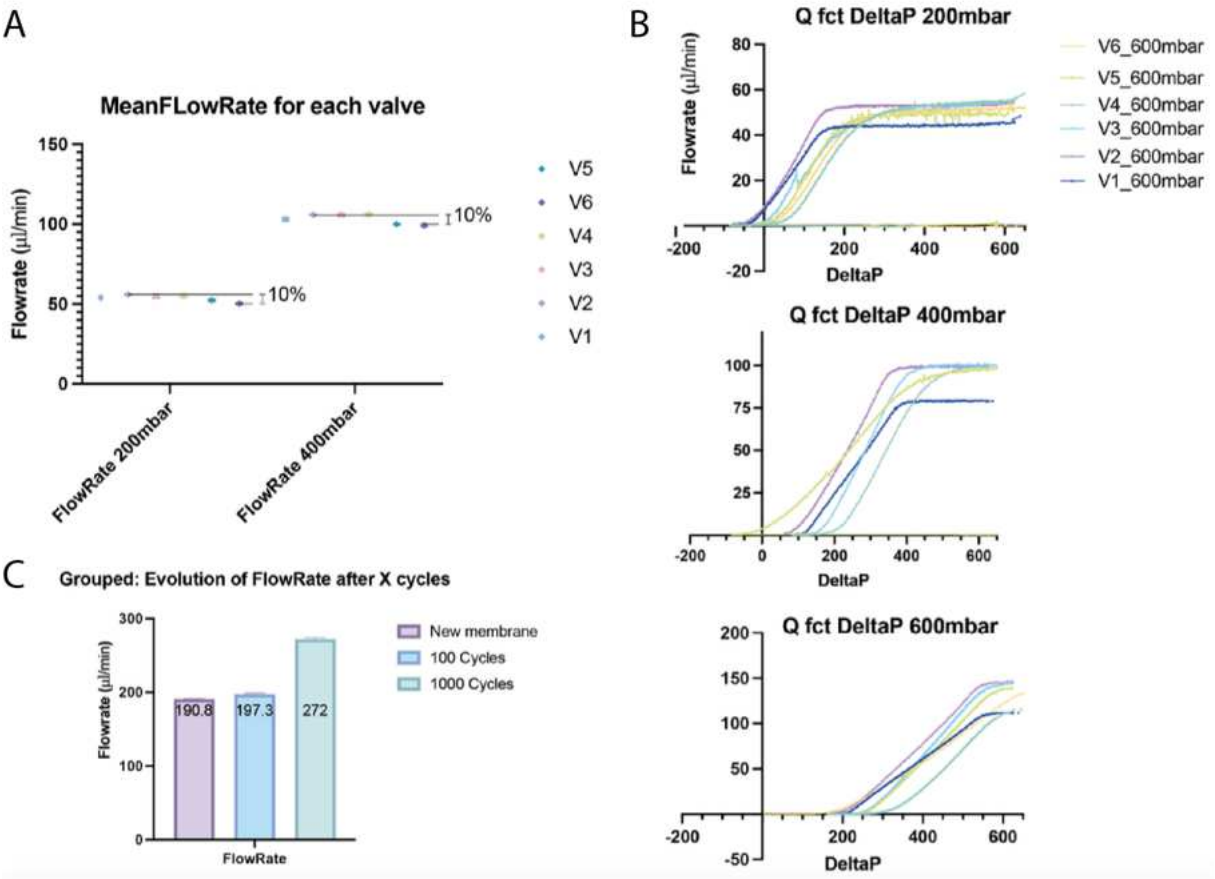



*Figure 40 Caractérisation des microvalves. (A) Débits atteignables à 200 et 400 mbar de pressurisation de fluide sur les 6 valves. (B) Débit en fonction de ΔP pour différentes valeurs de pression fluidique sur les 6 valves. (C) Évolution du débit moyen des 6 valves avec une pression fluidique de 400 mbar sur 1, 100 et 1000 cycles.*

Lorsque les vannes sont ouvertes (pression sur la membrane à -800 mbar), nous avons montré que nous sommes capables d'atteindre un débit de 100 ±10 µL/min pour toutes les vannes lorsque le fluide est pressurisé par le FlowEZ™ à 400 mbar. De plus, à chaque augmentation de 200 mbar de pressurisation du fluide, le débit augmente de 50 ±5 µL/min (Figure n°40 A). Avant d'aborder les tests plus poussés pour caractériser les valves, définissons un certain nombre de variables importantes ainsi que le comportement théorique attendu des microvalves. Tout d'abord, posons $P_{Drain}$ comme la pression du fluide à l'entrée de la valve et $P_{GateF/O}$ comme la pression appliquée sur la membrane :

$$P_{Drain} = \frac{F_{Drain}}{S_{Drain}} \text{ et } P_{GateF/O} = \frac{F_{GateF/O}}{S_{Membrane}}$$

La pression $P_{GateF/O}$ s'applique sur la totalité de la surface de la membrane $S_{Membrane}$, tandis que la pression $P_{GateF/O}$ ne s'applique que sur la surface de la membrane en contact avec les canaux appelé $S_{Drain}$, détails dans la figure n°39 A, avec la $S_{Drain}$ en jaune et $S_{Membrane}$ en violet et leurs formules associées. En appliquant un bilan des actions mécaniques sur la membrane selon l'axe vertical et en négligeant le poids de la membrane (ses dimensions rendant son poids négligeable par rapport aux forces appliquées sur la membrane) on a :

$$F_{Drain} - F_{GateF/O} = 0$$

Soit :

$$P_{GateF/O} = \frac{P_{Drain} S_{Drain}}{S_{Membrane}}$$

Si l'on défini une constance de membrane que nous appelons $C_M = \frac{S_{Drain}}{S_{Membrane}}$, on a alors la pression de fermeture et d'ouverture $P_{GateF/O}$ directement proportionnelle par le facteur $C_M$ à la pression du fluide $P_{Drain}$.

Il est a noter que $C_M < 1$ car la surface des canaux en contact avec la membrane est inférieure à la surface totale de la membrane. Ainsi on a $P_{GateF/O} < P_{Drain}$ et nous définissons $\Delta P$ comme :

$$\Delta P = P_{Drain} - P_{GateF/O} = P_{Drain}(1 - C_M) > 0$$

Et nous pouvons conclure que la membrane s'ouvre et le passage du fluide s'opère si :

$$P_{GateF/O} < C_M P_{Drain}$$

Et la membrane se ferme avec arrête de la circulation fluidique si :

$$P_{GateF/O} \geq C_M P_{Drain}$$

Cette modélisation théorique simplifiée, imaginant une membrane qui se déforme de manière parfaitement homogène, un usinage des pièces parfaits et une absence d'effet d'adhésion de la membrane nous assure qu'étant donné que $C_M < 1$ nous sommes toujours capable de fermer la membrane peu importe la pression fluidique $P_{Drain}$. De plus, ce facteur permet de nous assurer théoriquement que lorsque que la valve est fermée avec une pression $P_{GateF/O}$=1000mbar, il faut dans notre géométrie, une pression amont de 12500mbar pour commencer à soulever la membrane et ouvrir contre son grès la microvalves, cette pression est inaccessible avec le système MAARS donc les valves fermées bloquent systématiquement le passage fluidique.

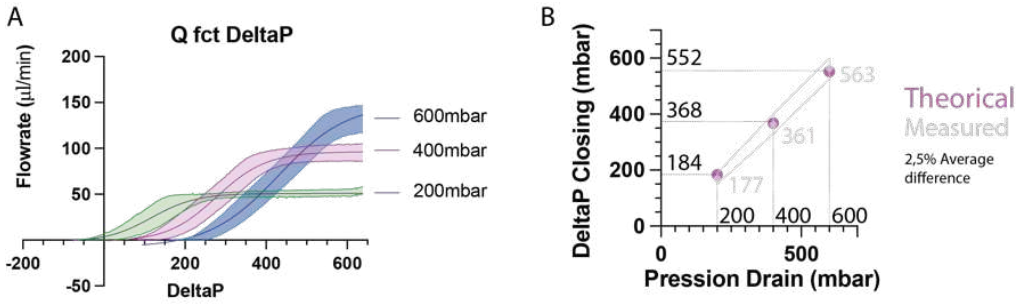



*Figure 41 Évolution du débit en fonction de ΔP lors de la fermeture graduelle des valves. (A) Évolution du débit en fonction de ΔP pour différentes pressions fluidiques. (B) Valeur mesurée du début de mise en mouvement de la membrane pour fermer les valves en fonction de différentes pressions fluidiques.*

Toutefois lorsque la membrane est ouverte, la pression s'applique sur une plus grande surface et le facteur $C_M$ se rapproche de la valeur 1. Nous avons donc procédé à des tests pour quantifier les pressions de fermetures et d'ouverture des différentes membranes en fonction d'un $P_{Drain}$ évoluant de 200 à 600mbar. Nous avons tracé la valeur du débit en fonction de $\Delta P$ et nous pouvons premièrement constater une variabilité de la valeur de $\Delta P$ pour que le débit soit nul entre les membranes, avec des variations pouvant atteindre 200mbar, et pour certaine une valeur de $\Delta P$ négative avant arrêt complet du débit, mettant en avant des défauts d'ouverture et de fermeture de certaines valves (Figure n°40 B) (Figure n°38). Deuxièmement, plus la pression de fluide d'entrée augmente, plus la valeur $\Delta P$ pour fermer la membrane est grande, conformément au modèle théorique. Pour une valeur de $P_{Drain}$ de 200, 400 et 600mbar les pressions relevées qui comment à faire chuter le débit en fermant les valves sont

respectivement 184, 368 et 552mbar ce qui nous donne une valeur de $C_{Mexpé} = 0{,}92 \pm 0{,}01$ montrant que lorsque la valve est ouverte la membrane est en moyenne en contact avec du fluide sur 92% de sa surface.

Ainsi, grâce à cette caractérisation, nous avons pu confirmer l'utilisation de microvalves pneumatiques présentant les caractéristiques suivantes : un diamètre de 1000 µm, une distance intercanaux de 500 µm, et une épaisseur de membrane de 150 µm pour le contrôle du passage fluidique. Cependant, comme nous l'avons constaté, malgré la fonctionnalité des valves, une variabilité non négligeable existe entre elles. Le matériau utilisé pour la membrane, bien que protégé par un double liner, reste un adhésif. Une dégradation de ce liner pourrait exposer l'adhésif, entraînant une adhésion indésirable de la membrane et compromettant son bon fonctionnement (ouverture et fermeture). Nous reviendrons sur ce point dans la section des améliorations futures et des perspectives d'industrialisation.

Maintenant que le comportement des microvalves a été validé, nous pouvons nous intéresser aux différentes architectures fluidiques et pneumatiques développées pour l'adressage de la puce multiplexée.

### 8.2.2 Architecture fluidique, pneumatique et versatilité

Dans le but d'avoir un système de distribution versatile, il est nécessaire que la couche fluidique s'adapte au design de la puce de l'utilisateur. Comme nous l'avons mentionné précédemment, dans notre approche de matrice de points d'entrée et de sortie fluidiques, la sélection des points d'entrée et de sortie de la couche d'interconnexion pour un design de puce est la première étape de versatilité. Pour l'architecture de la couche fluidique, nous avons développé un algorithme qui permet, en fonction des points d'entrée et de sortie fluidiques, de concevoir automatiquement l'architecture des canaux la plus courte et efficace, en minimisant les singularités comme les coudes afin de prévenir la perte de pression et la formation de microbulles. Cet algorithme peut ainsi être utilisé pour n'importe quel design de puce afin de déterminer l'architecture fluidique la plus adaptée (algorithme disponible sur https://github.com/PoinsotM/Code).

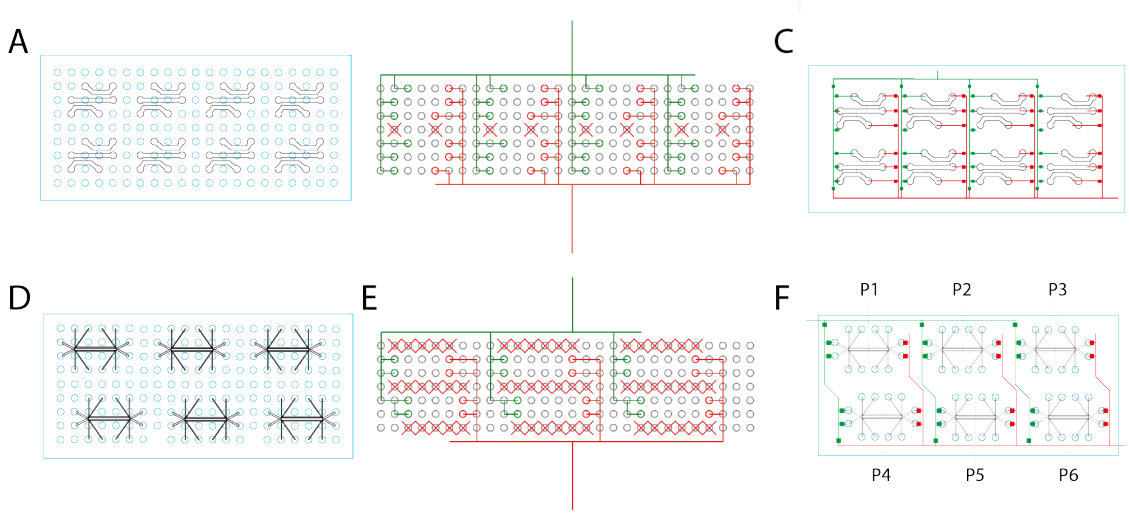



*Figure 42 Architecture fluidique théorique. (A)(D) Matrice de points d'entrée et de points de sortie pour deux différents designs de puce multiplexée. (B)(E) Algorithme pour déterminer l'architecture fluidique optimisée, avec, en vert, les points d'entrée sélectionnés et le chemin d'entrée fluidique, en rouge, les points de sortie et le chemin de sortie fluidique. Les croix rouges représentent des obstacles infranchissables sélectionnés par l'utilisateur. (C)(D) Placement schématique des microvalves représentées par les carrés verts et rouges, et l'adressage pneumatique spécifique pour les chambres latérales de la puce Emulate, notés P1 à P6.*

Pur démontrer la fonctionnalité et l'universalité du système pour plusieurs géométrie de puces, nous avons utilisé cet algorithme pour concevoir les chemins fluidiques d'entrée et de sortie de la puce développée dans l'étude 1 (Figure n°42 A, B), ainsi que pour la puce commerciale la plus couramment utilisée, la puce à double compartiment avec canaux pneumatiques latéraux d'Emulate (Figure n°42 D, E). Il est également possible de définir des obstacles lors de la création des chemins fluidiques afin d'empêcher les chemins de passer à certains endroits. Cela est particulièrement utile pour des puces comme celle d'Emulate, afin de réserver certains points d'entrée pour le contrôle des canaux pneumatiques latéraux (Figure n°42 F).

Dans le système MAARS final, nous voulons pouvoir injecter jusqu'à 8 solutions différentes dans les puces ; ainsi, il faut intégrer à l'architecture fluidique 8 puits d'entrée pour les solutions, qui, par le chemin fluidique d'entrée, viennent perfuser les puces (Figure n°43 B). Enfin, il faut intégrer les microvalves le long du chemin fluidique pour autoriser ou non la circulation jusqu'à un point d'entrée fluidique de la puce. Pour réduire au maximum les volumes morts qui peuvent exister dans les canaux entre la microvalve et le point d'entrée fluidique, il est nécessaire de placer la microvalve le plus proche possible de l'entrée fluidique. C'est donc un véritable avantage d'avoir des microvalves d'1 mm de diamètre, comme celles que nous avons développées pour minimiser les volumes morts. La position schématique des

microvalves est représentée par des carrés (Figure n°43 A), et l'architecture fluidique finale peut être dessinée en intégrant les 8 entrées des solutions avec leurs microvalves associées et la sortie fluidique du système de distribution (Figure n°43 B). On constate qu'il y a des microvalves devant chaque entrée fluidique et après chaque sortie fluidique, qui servent respectivement à autoriser ou non le passage du fluide et à empêcher la diffusion ou le « backflow » de fluide dans un compartiment non désiré. Pour cette architecture fluidique, nous avons un total de 60 microvalves : 48 pour les entrées et sorties fluidiques, 8 pour l'entrée des solutions, et 4 pour la ligne de purge qui sert à nettoyer les chemins fluidiques et éviter les contaminations croisées. Avec autant de microvalves à contrôler de manière indépendante, on comprend que l'adressage pneumatique est un challenge majeur. Dans un raisonnement littéral, avec 60 microvalves, il faudrait 60 adressages pneumatiques, ce qui est coûteux et encombrant. Il est possible de repenser cette approche pour réduire le nombre de points d'adressage. En utilisant une approche matricielle, on peut décomposer l'adressage des microvalves en lignes et colonnes. Ainsi, un adressage pneumatique commande toutes les microvalves d'une ligne, tandis qu'un autre adressage pneumatique commande toutes les microvalves d'une colonne. Dans notre système de distribution, nous avons 7 lignes de perfusion (6 pour les entrées et sorties fluidiques de la puce, 1 pour la ligne de flush) et 4 colonnes, soit un total de 11 adressages pneumatiques pour 52 microvalves. Concernant les microvalves de sélection des entrées des solutions, il n'est pas possible de les réduire. Ainsi, nous passons de 60 adressages pneumatiques à 19 dans cette architecture. Pour illustrer le fonctionnement, que nous détaillerons par la suite, si nous souhaitons perfuser le cinquième compartiment de la puce multiplexée située sur la troisième colonne, il suffit d'ouvrir simultanément les microvalves contrôlées par C3 et L5 (Figure n°43 A).

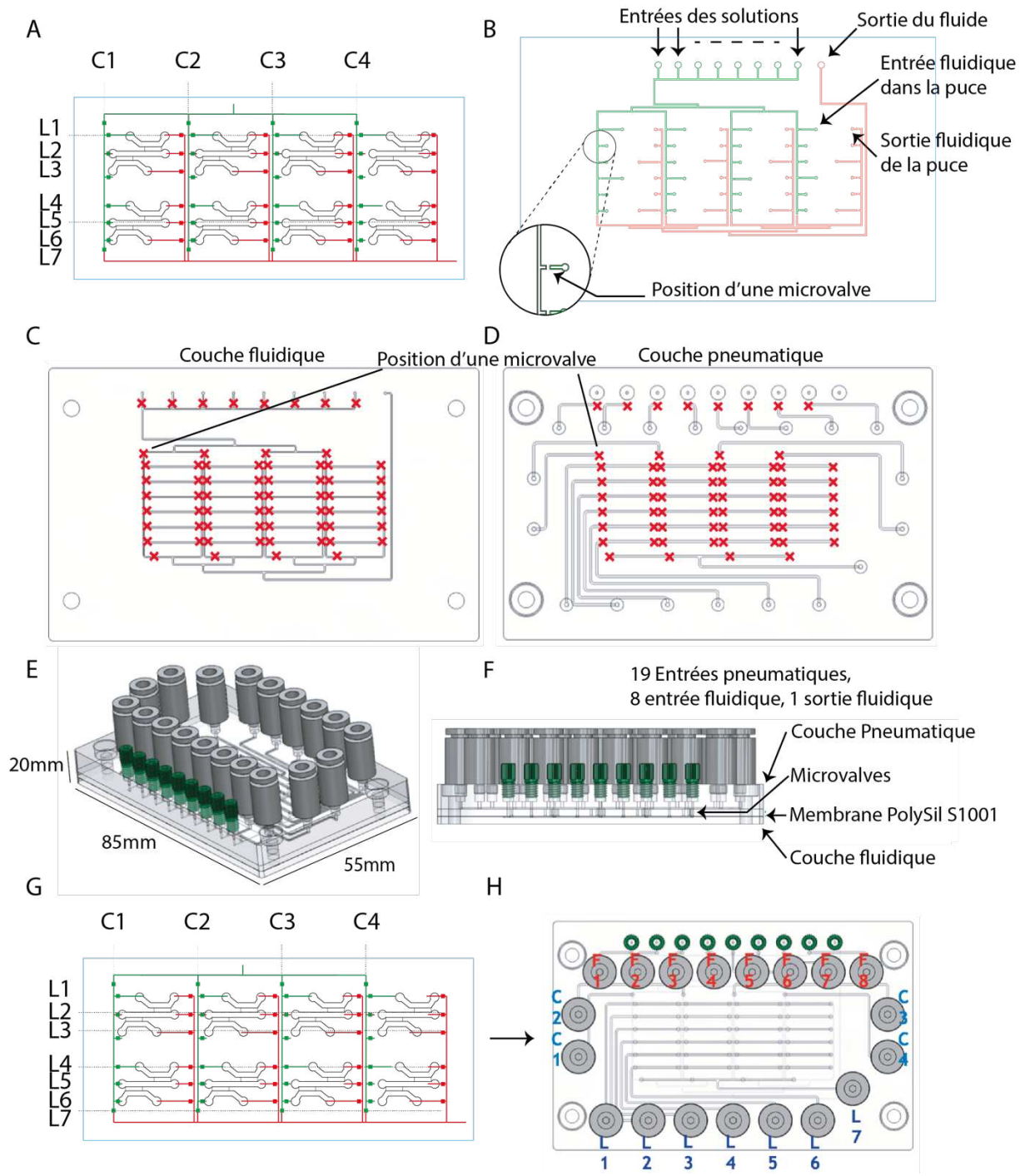



*Figure 43 Prototype du module de distribution microfluidique. (A) Stratégie d'adressage pneumatique des microvalves. (B) Dessin final de l'architecture fluidique avec les 8 entrées des solutions, incluant l'ajout d'une ligne de flush en bas entre le chemin d'entrée fluidique et le chemin de sortie fluidique. (C) Dessin technique de la couche microfluidique avec la position des microvalves marquées par des croix rouges. (D) Dessin technique de la couche pneumatique avec la position des microvalves marquées par des croix rouges. (E) Schéma 3D avec les connecteurs : speedfit 3 mm pour les connexions pneumatiques et (ref) 1/16'' pour les connecteurs fluidiques. (F) Vue latérale du prototype du module de distribution fluidique avec les différentes couches. (G), (H) Adressage des 8 microvalves de contrôle des injections des solutions (F1 à F8) et de la sélection des lignes et colonnes pour le passage des solutions jusqu'à l'entrée fluidique connectée à la puce (C1 à C4 et L1 à L6). L7 est réservée au contrôle du flush.*

Nous avons ainsi prototypé les différentes couches du module (Figure n°43 C, D) en utilisant du polycarbonate, et nous les avons assemblées par PSA (Pressure Sensitive Adhesive) pour garantir l'étanchéité fluidique et pneumatique de l'ensemble. Le prototype assemblé a une hauteur totale (sans les connecteurs) de 20 mm, une largeur de 55 mm et une longueur de 85 mm (Figure n°43 E, F), le rendant compatible avec des holders de microscope pour des plaques 96 puits (84 mm x 126 mm). Nous avons identifié la position et le rôle de chaque connecteur pneumatique sur les Figures n°43 G, H pour pouvoir contrôler le module de distribution fluidique.

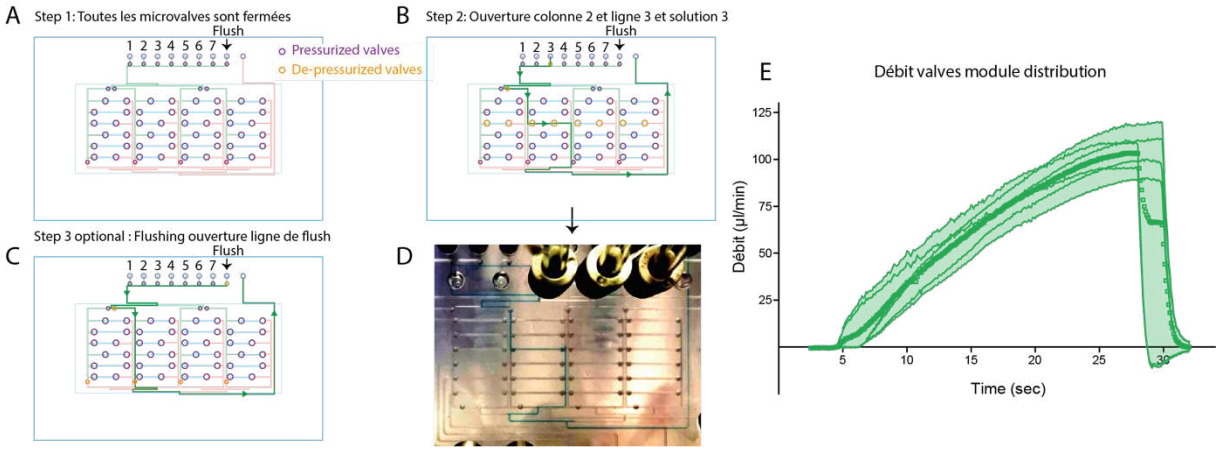



*Figure 44 Utilisation détaillée du système de distribution microfluidique MAARS. (A) Première étape : toutes les microvalves sont fermées et aucun fluide ne peut circuler. (B) Ouverture des microvalves de sélection de la solution 3, ainsi que de la colonne 2 et de la ligne 3 pour la circulation dans un compartiment désiré. (C) Fermeture des microvalves ouvertes précédemment et ouverture de la solution de flush, de la colonne 2 et de la ligne de flush pour nettoyer le chemin fluidique. (D) Photo de la circulation d'une solution aqueuse contenant un colorant bleu selon la condition d'ouverture de (B). (E) Évolution du débit sur 30 secondes lors de la mise sous pression progressive des fluides et fermeture des microvalves après 30 secondes (n=8 microvalves, 2 sur chaque colonne).*

Ainsi, avec ce prototype, nous avons vérifié que nous sommes capables, sur demande, de choisir le point d'injection souhaité. Un cas d'usage habituel de la plateforme MAARS sera la distribution d'une solution dans un compartiment spécifique (Figure n°44 A, B, D), puis le rinçage du module de distribution (Figure n°44 C) pour éviter toute contamination croisée et préparer la plateforme à une nouvelle injection. Des problèmes liés au bon décollement des microvalves sont encore présents, certaines nécessitant un cycle d'ouverture/fermeture avant de devenir opérationnelles. Avant de commencer les expériences, nous avons donc effectué un cycle d'ouverture/fermeture pendant 1 heure, avec 15 secondes à -800 mbar suivies de 30 secondes à +1000 mbar sur toutes les microvalves, en injectant de l'air à +1000 mbar dans les

chemins fluidiques (80 cycles). Cela a permis de rendre fonctionnelles l'ensemble des valves, permettant la circulation de débits entre 0 et 100 ±25 µL/min, et de se fermer toutes en moins de 1 seconde lors de l'application de 1000 mbar. Cependant, le besoin de pratiquer des cycles pour rendre les microvalves fonctionnelles, ainsi que la variabilité de plus de 20 % dans les débits atteignables, ne sont pas envisageables pour une industrialisation. Nous proposerons donc des pistes d'amélioration concernant ces problèmes dans les perspectives.

Le prototype de distribution étant fonctionnel, nous avons ensuite développé la station fluidique pour l'intégration des voies de pression et le contrôle de l'ensemble de la plateforme en utilisant le logiciel OxyGEN™.

## 8.3 Développement de la station fluidique

La station fluidique constitue le dernier élément à développer dans le prototype. Elle contient l'ensemble des solutions à injecter ainsi que toutes les composantes électroniques pour le contrôle de l'injection et de l'adressage pneumatique. Elle doit répondre à plusieurs spécifications essentielles : intégrer tous les composants électroniques, contenir 8 tubes Falcon de 15 ml ainsi qu'un flacon de déchets de 100 ml, et être adaptable pour des tubes de 1,5/2 ml. Le système doit rester compact, avec un poids total inférieur à 10 kg, afin de pouvoir être installé sur une paillasse à côté d'un microscope inversé ou déplacé avec un minimum d'effort. Il doit pouvoir se connecter à un ordinateur pour contrôler l'injection fluidique et les microvalves via le logiciel OxyGEN™ de Fluigent. Les câbles et tuyaux internes doivent être soigneusement dissimulés pour réduire l'encombrement, tandis que les sorties pneumatiques et fluidiques doivent être alignées en deux « nappes » distinctes, formant un ensemble de tubes facilement manipulable. L'alimentation en pression doit provenir de sources externes, sans pompe intégrée, afin de réduire le coût de la station fluidique et son poids. De plus, fonctionnant avec des pompes à pression standards (-800 mbar, +1000 mbar), la majorité des laboratoires et des industries en sont déjà équipés. Face à ces caractéristiques, nous avons réalisé un schéma synoptique de l'équipement (Figure n°45), que nous allons détailler dans ce chapitre.

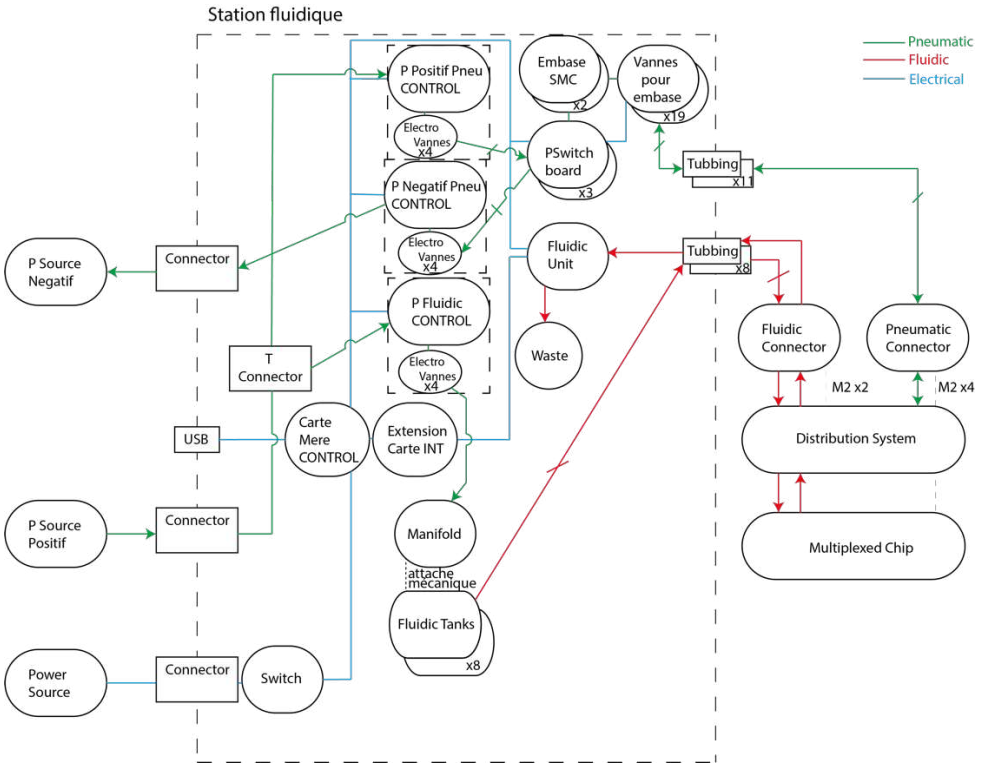



*Figure 45 Schéma Synoptique de la plateforme MAARS dans son ensemble avec un détail de l'intérieur de la station fluidique. En bleu sont reliés les différents éléments nécessitant une alimentation électrique. En rouge sont représentés les tubes en contact avec des liquides, et en vert les tubes du réseau pneumatique.*

### 8.3.1 Adressage des voies pneumatiques & fluidiques

Pour notre application, dans le module de distribution, nous avons besoin de 19 adressages pneumatiques distincts. Pour ce faire, et afin de limiter le besoin en sources de pression positive et négative pour contrôler les valves, nous avons opté pour deux embases (VV100-541-10-M5 SMC) qui distribuent, sur 10 sorties, contrôlées par électrovannes (V114T-5-MOZ SMC), une source de pression positive ou une source de pression négative (Figure n°46). Afin de limiter le développement d'électronique de contrôle, ainsi que les coûts et la complexité de la plateforme MAARS, nous avons décidé d'opter pour des éléments déjà en place chez Fluigent. Ainsi, le contrôle des électrovannes est réalisé en utilisant un module qui permet de contrôler l'état on/off de 8 microvalves (MEV-FOEM-4) (Figure n°46 A).

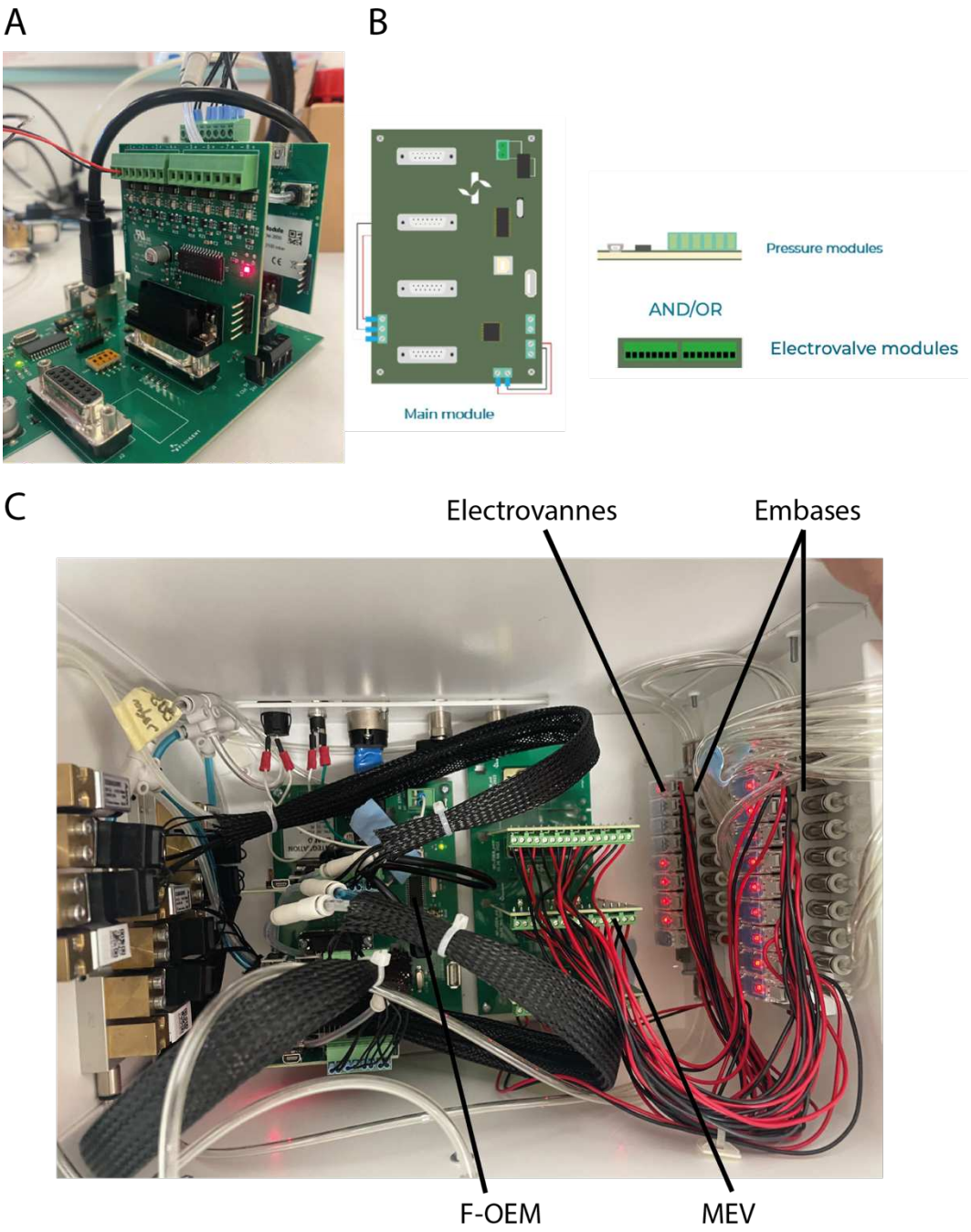
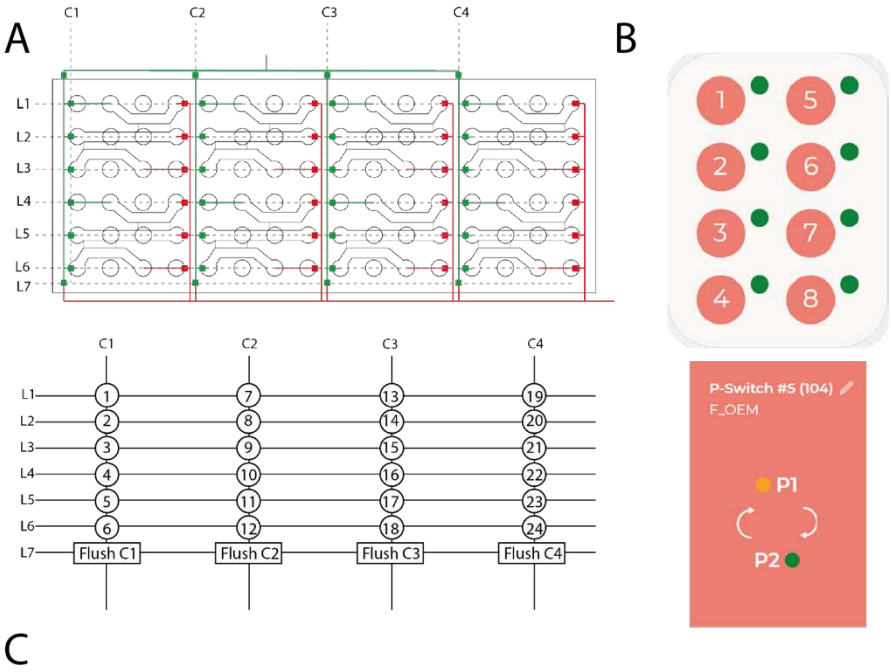



*Figure 46 Électronique de la plateforme MAARS. (A) MEV installé sur une carte FOEM. (B) Schéma de la carte FOEM avec ajout des contrôleurs de pression et des MEV. (C) Intérieur de la station fluidique MAARS.*

Ainsi, en utilisant trois de ces modules connectés à nos deux embases, nous sommes capables de contrôler les 19 voies de pression de manière indépendante. Les MEV sont connectés et pilotés via la carte de contrôle électronique de Fluigent (F-OEM), qui reçoit et gère également les deux sources de pression, positive et négative (Figure n°46 B). Pour l'adressage fluidique, nous avons réutilisé la méthode développée pour la machine Aria™ de Fluigent, qui permet la mise sous pression et la distribution de huit solutions (Figure n°46 C). Une fois tous les

éléments connectés, il est possible d'utiliser le logiciel OxyGEN™ pour gérer la distribution fluidique ainsi que la distribution pneumatique via les électrovannes.




C

| | | | MEV 102 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| | | | C1 | C2 | C3 | C4 | |
| MEV 102 | 5 | L1 | 1 | 7 | 13 | 19 | Chip perfused |
| | 6 | L2 | 2 | 8 | 14 | 20 | |
| | 7 | L3 | 3 | 9 | 15 | 21 | |
| | 8 | L4 | 4 | 10 | 16 | 22 | |
| MEV 104 | 1 | L5 | 5 | 11 | 17 | 23 | |
| | 2 | L6 | 6 | 12 | 18 | 24 | |
| | 3 | L7 | Flush C1 | Flush C2 | Flush C3 | Flush C4 | |
| MEV 103 | 1 | F1 | Inject C1 | | | | Injection Fluidique |
| | 2 | F2 | | Inject C2 | | | |
| | 3 | F3 | | | Inject C3 | | |
| | 4 | F4 | | | | inject C4 | |
| | 5 | F5 | Injec C1 | | | | |
| | 6 | F6 | | Inject C2 | | | |
| | 7 | F7 | | | Inject C3 | | |
| | 8 | F8 | | | | Inject C5 | |

*Figure 47 Adressage de la puce multiplexée par les MEVs. (A) Schéma de la puce et des adressages pneumatiques avec une figure représentative des points à perfuser (1, 2, 3 … 24). (B) Représentation du MEV sur l'interface graphique Oxygen™ avec P1 pour la pression négative permettant d'ouvrir les microvalves et P2 pour la pression positive permettant de les fermer. (C) Tableau d'adressage pour sélectionner sur Oxygen™ les switchs afin d'ouvrir ou fermer les microvalves.*

Les MEV de contrôle des électrovannes sont représentés avec leurs sorties numérotées de 1 à 8, contrôlant chacune l'état d'une électrovanne, ainsi que les deux pressions P1 et P2, dans notre cas P1 = 1000 mbar et P2 = -800 mbar (Figure n°47 B). Le switch de P1 à P2 sur la borne d'un MEV permet d'ouvrir les microvalves dans le système de distribution. Lors du montage de la station fluidique, nous avons mis en place une table d'adressage pour faire correspondre les adresses électroniques commandées par les MEV aux adressages pneumatiques des

microvalves (Figure n°47 A, C). Par exemple, si nous souhaitons perfuser le compartiment 15 de la puce multiplexée, il suffit de basculer sur la pression P2 les électrovannes aux bornes 3 et 7 du MEV 102, permettant d'envoyer -800 mbar sur la colonne 3 et ligne 3 du module de distribution, ouvrant ainsi les microvalves désirées. Ensuite, pour le flush, il suffit de refermer toutes les électrovannes sur P1 et de basculer sur P2 la borne 3 du MEV 102 et la borne 3 du MEV 104, permettant le flush de la colonne 3 du système de distribution.

Ainsi, avec cet adressage, nous sommes capables de contrôler tous les adressages pneumatiques du système de distribution et d'envoyer, sur commande, du fluide dans les compartiments de la chambre multiplexée désirés.

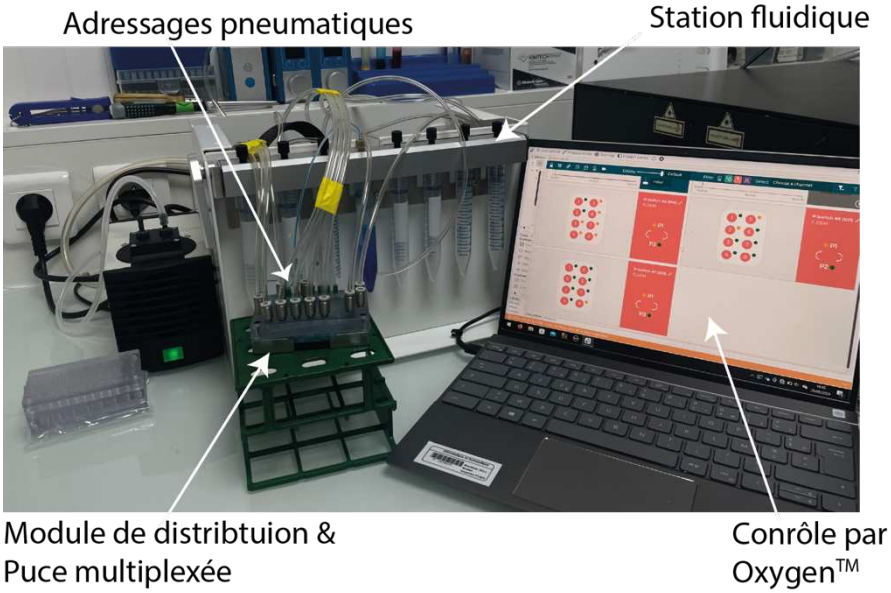



*Figure 48 Plateforme prototype MAARS assemblée, avec la station fluidique, la distribution d'une solution dans le module de distribution connecté à la station fluidique et contrôlée par le logiciel Oxygen™.*

### 8.3.2 Connecteurs Standardisés

Le niveau d'intégration actuel se limite à un système de distribution fluidique avec des connexions fluidiques et pneumatiques individuelles, ce qui génère un nombre de tubes difficilement gérable et non optimisé. Nous avons développé un connecteur standardisé sous forme de « nappe de fils » qui permet de connecter 8 entrées fluidiques ou pneumatiques, réduisant ainsi l'encombrement généré par le tubing. L'étanchéité est réalisée par un joint qui s'écrase lors du serrage mécanique du connecteur sur le système de distribution (Figure n°49).

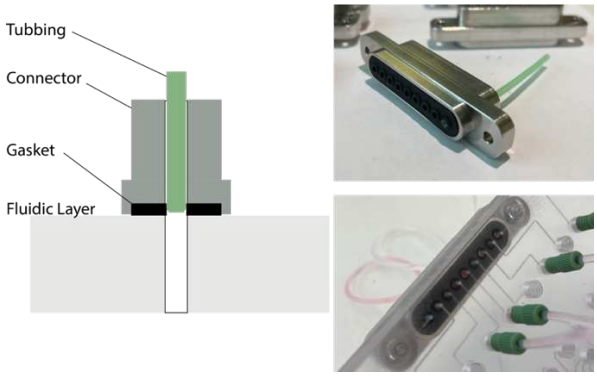



*Figure 49 Connecteur standard avec 8 entrées indépendantes.*

Nous avons pu tester et garantir l'étanchéité de l'ensemble. Néanmoins, cette solution n'a pas encore été déployée sur le prototype du module de distribution, car nous voulions d'abord valider une preuve de concept avant d'ajouter un niveau d'intégration supplémentaire.

## 8.4 Immunomarquage automatisé

Pour démontrer une première preuve de concept de la plateforme MAARS, nous avons réalisé un immunomarquage automatisé en tirant parti de ses capacités multiplexées, ce qui nous a permis d'effectuer différents marquages sur la même culture. Nous avons utilisé des progéniteurs neuronaux humains exprimant NGN2 (Human NGN2-expressing neuronal progenitors) pour les neurones, ainsi que des cultures neuronales primaires de rats sur d'autres puces. Les cultures ont été marquées à 10 jours *in vitro* (DIV 10), soit 10 jours après l'ensemencement pour les cultures primaires et 10 jours après la différenciation pour les progéniteurs neuronaux humains. L'application de paraformaldéhyde (PFA) a été réalisée manuellement, en dehors de la plateforme MAARS, afin d'éviter tout risque de contamination du prototype avec un agent fixateur qui aurait pour conséquence de compromettre son utilisation pour des expérimentations futures.

Je tiens à remercier Emmanuel Nivet (équipe Nivet, Institut de Neurophysiopathologie UMR 7051) et Ivan Fernandes Bessone (post-doctorant) pour la mise en culture et la différenciation des progéniteurs neuronaux humains.

Pour s'assurer de la bonne diffusion des différentes solutions jusqu'aux chambres, nous devons calculer le volume mort dans les tubes du système. Nous avons défini la formule suivante :

$$V_M = 1{,}3\left(L_T S_T + L_{distrib} S_{distrib} + L_{comp} S_{comp}\right)$$

où VM représente le volume mort, LT et ST la longueur et la section du tubing de 1/16'', Ldistrib et Sdistrib la longueur et la section des canaux fluidiques dans le système de distribution, ainsi que Lcomp et Scomp la longueur et la section d'un compartiment de la puce multiplexée. Pour nos calculs, nous avons choisi le compartiment le plus éloigné de la puce afin de maximiser Ldistrib, en ajoutant un facteur de sécurité de 1,3 (soit 30 % de volume mort supplémentaire). Ainsi, dans nos conditions, nous avons estimé un volume mort de 45 µL.

Toutes les expériences ont été réalisées à un débit de 50 µL/min afin de ne pas endommager les neurones. Il nous fallait donc au minimum 2 minutes de perfusion pour garantir que la chambre était complètement perfusée avec le milieu souhaité. Nous avons opté pour une durée de perfusion de 3 minutes. Les étapes de rinçage (flushing) ont été effectuées à un débit de 100 µL/min, ce qui nécessitait au minimum 27 secondes de rinçage. Nous avons choisi d'effectuer deux cycles de 30 secondes afin de garantir un lavage adéquat du tubing et des compartiments.

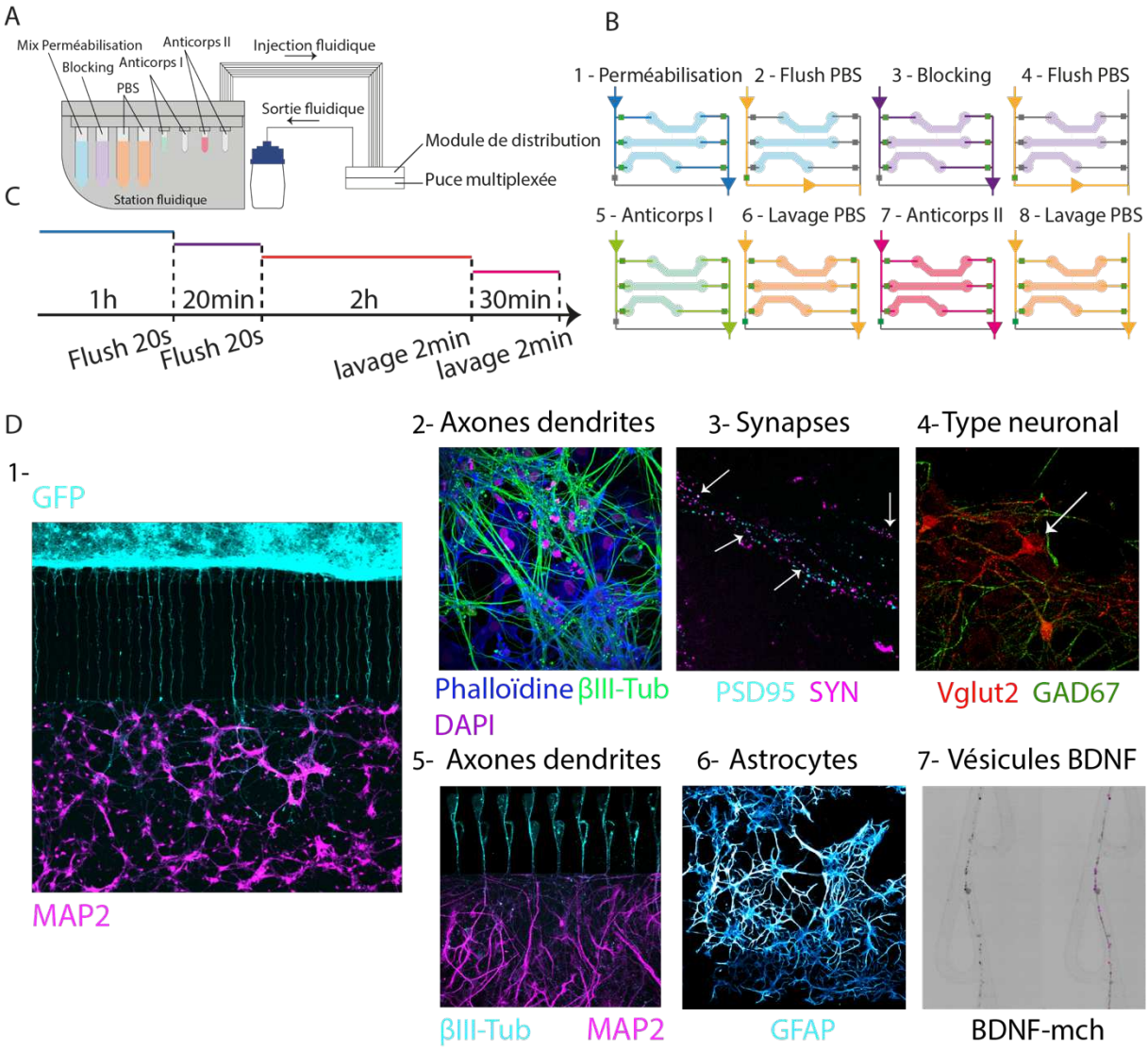



*Figure 50 Utilisation de la plateforme MAARS pour immunomarquage automatisé. (A) Schéma de la plateforme avec les différentes solutions installées. Dans cet exemple, deux anticorps primaires (I) et leurs anticorps secondaires (II) respectifs sont représentés. (B) Protocole d'immunomarquage automatisé appliqué à un design répété dans une puce multiplexée. (C) Chronologie du marquage sur la puce multiplexée. (D) Images obtenues sur les puces multiplexées après immunomarquage automatisé : 1. Neurones corticaux marqués par GFP (cyan) et neurones striataux marqués par MAP2 (magenta) provenant de cultures primaires de rats. 2. Marquage de différents composants d'une population de progéniteurs neuronaux humains : BIII-tubuline (vert) pour les axones, phalloïdine (bleu) pour l'actine, et DAPI (violet) pour les noyaux cellulaires. 3. Marquage des synapses avec PSD95 (cyan) pour les postsynapses et synaptophysine (magenta) pour les présynapses ; la colocalisation des synapses est indiquée par des flèches blanches. 4. Neurones glutamatergiques identifiés (flèche blanche) par le marquage du transporteur vésiculaire de glutamate Vglut2 (rouge), avec certains neurones exprimant l'enzyme GAD67 (vert). 5. Unidirectionnalité de la communication neuronale observée dans l'étude 1 ; axones marqués par BIII-tubuline (cyan) projetant vers une population neuronale marquée par MAP2 (magenta), réalisée à partir de progéniteurs neuronaux humains. 6. Astrocytes marqués par GFAP (cyan) dans une culture neuronale primaire de rat. 7. Visualisation avant marquage du trafic des vésicules de BDNF marquées par mCherry (noir) dans les axones traversant les microcanaux (des vidéos sont disponibles en annexe).*

Les huit supports de solution de la machine MAARS nous permettent de mettre jusqu'à 4 anticorps primaires différents, qui seront exprimés avec le même anticorps secondaire (nonobstant la même espèce), en plus des solutions de blocage, de perméabilisation et de lavage PBS. Ensuite, les solutions peuvent être changées pour installer de nouveaux binômes d'anticorps et continuer le marquage (Figure n°50 A). Théoriquement, avec la puce de l'étude 1 multiplexée 8 fois et un microscope classique équipé d'un cube permettant la visualisation de 3 longueurs d'onde, il est possible, en un immunomarquage automatisé, d'étudier 24 marquages différents dans un temps réduit. Nous avons choisi de marquer des paramètres essentiels à la validation de cultures neuronales matures et fonctionnelles, en marquant la compartimentation des différentes populations (Figure n°50 D,1), la morphologie des neurones et des astrocytes (Figure n°50 D,2,6), la formation de synapses entre les axones et les dendrites, ainsi que le trafic de vésicules de BDNF (Figure n°50 D,3,5,7), et les types neuronaux présents dans la culture en utilisant des marqueurs du transporteur vésiculaire du glutamate Vglut2 (marqueur de neurones excitateurs de type glutamatergiques) et de l'enzyme GAD67 (marqueur de neurones inhibiteurs de types GABAergiques) (Figure n°50 D,4). Néanmoins, le degré d'intégration du prototype n'étant pas suffisant, nous avons dû piloter l'immunomarquage manuellement et vérifier régulièrement la présence ou non de fuites. Nous discuterons dans le sous-chapitre suivant des améliorations envisagées pour automatiser complètement les protocoles expérimentaux sur la plateforme MAARS.

## 8.5 Améliorations envisagées pour l'industrialisation

Comme évoqué dans le développement des différentes parties du prototype, bien que la plateforme MAARS soit fonctionnelle pour la réalisation d'immunomarquages automatisés, elle présente encore un niveau d'intégration insuffisant pour des expériences en temps réel dans un environnement de microscope sur cellules vivantes. De plus, le prototype actuel n'est pas encore prêt pour une industrialisation. Dans cette section, nous reviendrons en détail sur les limites de ce qui a été développé, en évaluant leur potentiel d'industrialisation, ainsi que sur les développements futurs envisagés pour améliorer l'intégration. Enfin, nous détaillerons deux preuves de concept qui nous semblent essentielles à réaliser pour la plateforme MAARS.

### 8.5.1 Microvalves et Module de distribution

Pour les microvalves et le module de distribution, une multitude de problèmes ont été relevés, et de nombreuses améliorations peuvent être envisagées pour rendre le module industrialisable. Tout d'abord, comme nous l'avons évoqué, les microvalves réalisées avec la membrane en PolySil S1001 doivent subir plusieurs cycles avant de s'ouvrir et se fermer de manière systématique. Lors de la fabrication, pour obtenir des membranes de 100 µm d'épaisseur, le PolySil et ses couches de liner anti-adhérence sont laminés. Il est possible que, durant cette étape, le liner soit dégradé, ce qui expliquerait le caractère adhérent des membranes. Il serait intéressant d'identifier une membrane en Ecoflex™ transparent pour caractériser et produire de nouvelles microvalves ; néanmoins, l'Ecoflex™ n'est pas autoclavable. Les membranes en PDMS représentent une solution envisageable si l'autoclavage du module de distribution est jugé pertinent pour la suite du projet, bien que ce matériau présente des défauts d'absorption non spécifique.

Ensuite, dans l'optique d'une industrialisation et pour gagner en versatilité, il serait intéressant de standardiser au maximum le module de distribution avec des couches standards et d'autres consommables et/ou autoclavables (nous préciserons la standardisation du module de distribution juste après). Nous pourrions imaginer que les parties standards du futur module de distribution soient fabriquées par injection plastique en polystyrène ou polycarbonate clarifié, ce qui permettrait de diminuer grandement les coûts de production. Les couches fluidiques adaptées au design de la puce de l'utilisateur ne peuvent néanmoins pas être fabriquées en polystyrène, car celui-ci n'est pas micro-usinable aux dimensions que nous utilisons (quelques centaines de micromètres). Nous pourrions nous tourner vers le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), qui est micro-usinable et présente un coût de production plus faible que le polycarbonate, mais il n'est pas autoclavable et serait donc une partie consommable de plus il craquèle si il est en contact avec de l'éthanol. Pour l'autoclavage, des couches en copolymère/polymère d'oléfine cyclique peuvent être envisagées, mais leur coût de production est plus élevé que celui du PMMA. Ainsi, dans la suite du développement de la plateforme, des spécifications précises en termes de coût, de durée de vie et/ou de réutilisation sont essentielles pour choisir les matériaux de la membrane et du module les plus pertinents.

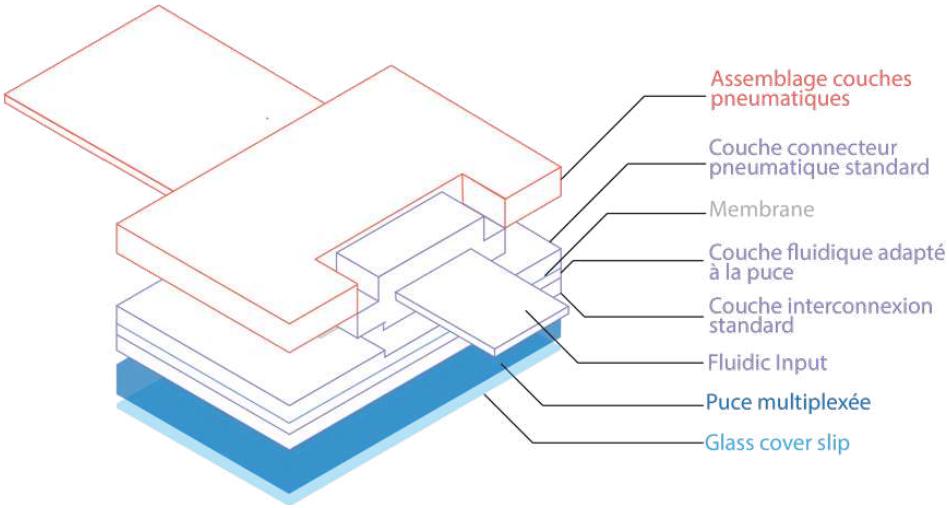



*Figure 51 Schéma théorique du module de distribution standardisé avec les différentes couches et les connecteurs. Les couches du module pneumatique sont détaillées dans la suite du chapitre.*

En ce qui concerne la standardisation du module de distribution, nous avons identifié des couches communes à tous les designs des puces multiplexées, ainsi que d'autres qui doivent s'y adapter. Nous avons envisagé de séparer les couches contrôlant l'adressage pneumatique de celles contenant les microvalves et l'architecture fluidique. De même, la couche permettant l'interconnexion avec la puce multiplexée peut être séparée et standardisée (Figure n°51). Pour le module de contrôle pneumatique standard, il est possible de créer une architecture en trois couches qui permet, selon notre matrice de points d'entrée et de sortie, d'adresser 31 voies pneumatiques (Figure n°52). Nous aborderons également les améliorations nécessaires à apporter à la station fluidique pour l'adressage de ces 31 voies.

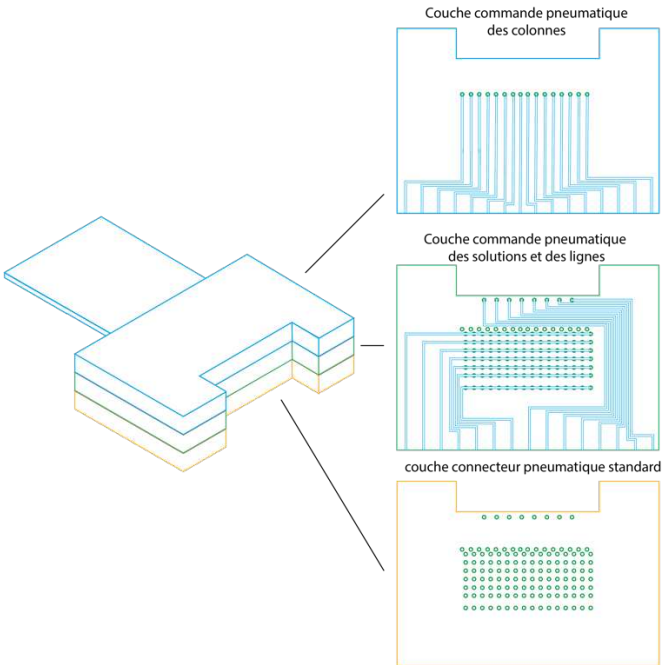



*Figure 52 Schéma de l'architecture tri-couches standardisée du module d'adressage pneumatique.*

Cet ensemble de couches standardisées formant le module pneumatique pourra être connecté mécaniquement (vis, clampage, etc.) aux couches du module de distribution fluidique. Ce module est également composé de trois couches : une couche de transfert située au-dessus de la membrane, permettant le transfert de l'adressage pneumatique, la membrane déformable, et la couche fluidique adaptée au design de la puce multiplexée. Pour assurer le transfert de la pression sur les microvalves du module de distribution fluidique, la couche de transfert est usinée selon le modèle de notre matrice de distribution. Les points qui ne sont pas utilisés pour former des microvalves peuvent être obstrués à l'aide de pièces en plastique vissables, que nous appelons obstruateurs.

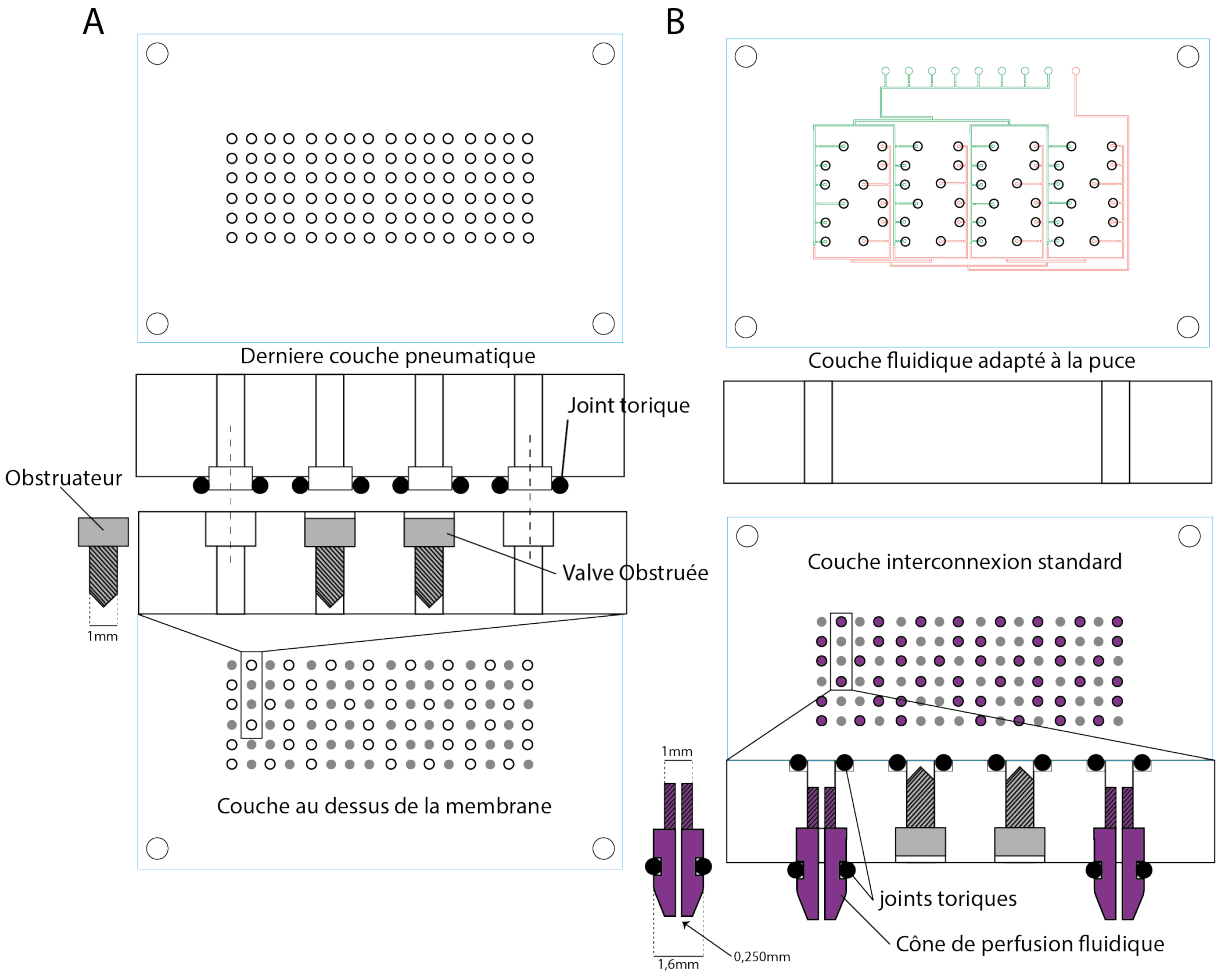



*Figure 53 Vue éclatée de l'architecture de transmission de pression et de distribution fluidique. (A) De haut en bas : Couche standardisée du module pneumatique et couche du module de transfert avec les obstruateurs placés pour correspondre au design de l'architecture fluidique développée pour la puce multiplexée de l'étude 1, vue de côté et vue de dessus. (B) De haut en bas : Couche fluidique adaptée à la puce multiplexée de l'étude 1 et couche d'interconnexion à la puce multiplexée avec les obstruateurs et les cônes de perfusion fluidique.*

Ainsi, seuls les points de transfert non obstrués permettent le passage de la pression pour contrôler la déformation de la membrane sur les microvalves du design adapté à la puce multiplexée (Figure n°53 A). La couche fluidique adaptée au design est assemblée avec la membrane et la couche de transfert par des méthodes assurant l'étanchéité, comme des adhésifs sensibles à la pression, que nous avons utilisés pour le prototype. Enfin, cet ensemble sera connecté mécaniquement au module d'interconnexion standard, qui présente également la matrice de distribution. Conformément à la puce multiplexée à laquelle l'ensemble sera connecté, les points d'accès de ce module d'interconnexion peuvent être obstrués avec les mêmes obstruateurs utilisés pour la couche de transfert, ou avec des cônes de perfusion fluidique autorisant la distribution du fluide dans la puce multiplexée (Figure n°53 B). L'étanchéité entre les différentes couches sera assurée par l'utilisation de joints toriques standards disponibles sur le marché (O-ring 1x1 mm Z1352, allorings.com, par exemple).

Pour conclure, avec cette approche modulable, il est théoriquement possible d'adresser un grand nombre de puces avec la seule contrainte de concevoir la couche fluidique adaptée au design de la puce multiplexée à adresser, les autres couches étant standard et communes. Cette proposition de standardisation n'est pour l'instant que théorique et un travail d'approfondissement est nécessaire pour le dimensionnement du système et de ses caractéristiques face aux spécifications qui seront retenues.

### 8.5.2 Interconnection Puce multiplexée- Module de distribution

Le système d'étanchéité et de maintien en position entre le module de distribution et la puce plastique repose sur une technique d'emboutissage dans le PDMS, permettant de le déformer pour assurer l'étanchéité. Le maintien en position est assuré par un système de vissage. Cependant, comme nous en avons discuté, cette approche présente des limitations. Le serrage manuel individuel des vis ne garantit pas une répartition homogène de l'effort sur toute la surface du PDMS, ce qui peut engendrer des problèmes d'étanchéité.

Nous avons présenté plus haut des améliorations du système de distribution qui permettraient d'ajouter des joints toriques pour améliorer l'étanchéité de la perfusion. Néanmoins, le PDMS étant peu adapté à l'industrialisation, il serait intéressants, de produire un design en polymère

(PMMA,COC, PC, etc) et de travailler sur des preuves de concept en utilisant une interconnexion entre le système de distribution et cette puce multiplexée.

De plus même si la première version de la station fluidique présente un niveau d'intégration satisfaisant grâce à l'utilisation de sous-systèmes déjà commercialisés par Fluigent. Néanmoins, pour adresser les 31 voies pneumatiques possibles avec notre approche matricielle, il serait nécessaire d'ajouter un MEV (modules de contrôle des électrovannes) et une embase avec des électrovannes. De plus, même si les connecteurs fluidiques et pneumatiques ont déjà commencé à être développés et testés, il est essentiel de poursuivre les essais et de concevoir les nappes de tubage et les connecteurs afin de réduire l'encombrement, faciliter l'installation et réduire des erreurs de manipulation.

### 8.5.3 Software

L'utilisation du logiciel OxyGEN$^{TM}$ permet de sélectionner manuellement les vannes de pression via l'interface graphique des MEV. Cependant, cette méthode s'avère peu pratique, nécessitant une fiche d'adressage pour identifier la correspondance entre les actionneurs des MEV et les vannes actionnées, ce qui complique l'opération. Pour améliorer la facilité d'utilisation, il serait nécessaire de développer une interface graphique représentant la puce multiplexée et ses points d'accès. L'utilisateur pourrait ainsi simplement choisir les compartiments à perfuser, et les électrovannes correspondantes seraient automatiquement actionnées par le système.

# Matériels et méthodes

### Fabrication de microfluidiques

Le design de la puce micro fluidique multiplexée est une répétition de la puce trois compartiments développé dans l'étude 1.

### Wafer de silicium

Pour créer la puce, un wafer de silicium de 76,2mm (3 pouces) a été réalisé en utilisant un procédé de photolithographie à double épaisseur. Une première couche de SU-8 2002 (haute de 5 µm) a été déposée par centrifugation (1000rpm) sur une plaquette de silicium de 3 pouces, puis cuite à 95°C, exposée (avec un aligneur de masque EVG 620 et une quantité d'énergie lumineuse par unité de surface de 80mj/cm$^2$) et développée pour définir les microcanaux. Une seconde couche de SU-8 2050 (haute de 100 µm) a ensuite été déposée par centrifugation (3000rpm), cuite à 95°C pendant 20minutes et alignée sur la première couche développée pour construire des compartiments neuronaux et les chambres d'ensemencements. Enfin, une étape de durcissement finale (hard bake) a été réalisé à 130°C pour solidifier la SU-8. Les siliciums ainsi préparés sont déposés dans des boites de petri et du PDMS (Skylard 184, Dow Corning, ratio 10 :1) est coulé par-dessus, le PDMS est dégazé sous vide pendant 1h pour éliminer les bulles d'air emprisonné dans le PDMS et polymérisé à 70°C pendant 1 heure et 30 minutes.

### Réplication du moule et préparation des puces

Le wafer de silicium a ensuite été répliqué à l'aide de résine époxy (résine époxy R123, SoloPlast). Pour ce faire le PDMS coulé sur le wafer est récupéré et plongé dans le mélange d'époxy avec un ratio de 100g de base et 45g de durcisseur et laissé à polymériser pendant 48h à température ambiante. Le PDMS est ensuite démoulé et les moules en époxy ainsi que la pièce de prépunch en alimunium sont traités sous vide avec du trichlorosilane (Sigma 448931-10G) pendant 1h pour rendre la surface de l'epoxy non adhésive au PDMS.

Les puces microfluidiques en PDMS ont été préparées avec un mélange 10:1 d'élastomère de silicone et de son agents de durcisseur (Sylgard 184, Dow Corning). Les bulles d'air ont été éliminées sous vide pendant 1 heure, et la polymérisation du PDMS a été réalisée à 70°C pendant 1 heure 30 minutes. Les puces microfluidiques en PDMS ont ensuite été démoulées et découpées pour créer des puits d'ensemencements avec des punch à biopsie de 4mm. Ensuite, elles ont été nettoyées par sonication dans de l'éthanol 100%, rincées avec de l'eau distillée et séchées à 60°C pendant 15 minutes.

### Assemblage des puces

Le collage des puces avec les FluoroDish$^{TM}$, avec un fond en verre de 170 µm (FD35-100, World Precision Instrument) a été effectué à l'aide d'un traitement plasma à basse pression (Femto plasma cleaner, Diener Electronic, Allemagne) pendant 30 secondes à 70% de puissance et avec un vide de 4 mbar pour activer la surface. Le collage a été amélioré en incubant les puces à 60°C pendant 15 minutes pour créer des liaisons covalentes entre les puces microfluidiques et le FluorDishTM. Les dispositifs microfluidiques ont ensuite été soumis à un traitement plasma de 10 secondes , 70% de puissance 0,6mbar pour rendre les surfaces à l'intérieur de la puce hydrophile et permettre une circulation des solutions aqueuses juste avant la pipetage de la matrice extracellulaire.

### Application de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire a été injecté dans les différents compartiment de la puce et laissé toute la nuit à 4°C avec de la poly-D-lysine (0,1 mg/ml) dans les chambres corticales et avec un mélange de poly-D-lysine (0,1 mg/ml) et de laminine (5 µg/ml) dans la chambre striatale. Les puces ont ensuite été soigneusement lavées 5 fois avec du Neurobasal puis remplies avec un milieu de croissance (milieu Neurobasal supplémenté avec 2% de B27, 1% de glutamine 200 mM, et 1% de pénicilline/streptomycine) pour éliminer et ont été placées à 37°C avant que les neurones ne soient ensemencés.

### Culture neuronale primaire

Des rates Gestantes, RjHan:SD - Sprague Dawley – RN-SD-F, Janvier , à 17,5 jours de gestion et sacrifié pour le prévelements de tissus neuronaux sous l'accord du ministère de la recherche.

Les structures corticales et le striatum des embryons E17,5 ont été disséqué sous microscope dans une solution tampon d'HBSS/HEPES (10% HBSS 10X, 1% Hepes 1M, 89% H2O) refroidi sur glace. Les structures isolées ont été digérés enzymatiquement avec de la trypsine à 0,25% de concentration finale pendant 15 minutes à 37°C, suivi d'une solution d'inhibiteur de la trypsine SVF à 10% de concentration finale.
Les structures ont ensuite été dissociés manuellement par pipetage avec des pipettes pasteur rodées et filtré à travers un filtre 70µm pour isoler les progéniteurs cellulaires. Les solutions obtenues sont centrifugées à 300g pendant 5 minutes 2 fois et le surnageant et remplacée respectivement par du Neurobasal puis le milieu de croissance cellulaire (milieu Neurobasal supplémenté avec 2% de B27, 1% de glutamine 200 mM, et 1% de pénicilline/streptomycine).

Enfin les cellules sont comptées sur cellules de Bürker. Dans nos conditions la quantité de cellules isolées oscillé entre 35-45 millions de cellules par ml pour le cortex et 7-18 millions de cellules pour le striatum.

### Cultures IPSCs

*Différenciation des cellules progénitrices neuronales (NPCs)*

Les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSCs) ont été différenciées en cellules progénitrices neuronales (NPCs) selon une méthode de culture en monocouche, utilisant un milieu commercial d'induction neuronale via l'inhibition double de SMAD (STEMdiff™ SMADi Neural Induction Kit, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada), conformément à un protocole validé (Chambers et al. 2009). Les cultures non différenciées de hiPSCs ont d'abord été traitées avec StemPro™ Accutase™ (Gibco) pendant 5 minutes pour dissocier les cellules en cellules uniques. Celles-ci ont ensuite été transférées dans un milieu DMEM/F12 (Gibco) supplémenté à 20% de KnockOut™ Serum Replacement (Gibco). Après comptage, les cellules ont été centrifugées à 200g pendant 5 minutes, puis resuspendues dans le kit STEMdiff™ SMADi Neural Induction contenant 10 mM de Y-27632 (Tocris Bioscience, Bristol, UK). Les

cellules ont été placées dans des plaques préalablement recouvertes de Matrigel à facteur de croissance réduit (8,7 mg/cm²) à une densité de 320 000 cellules/cm², et incubées à 37°C avec 5% de $CO_2$, avec des changements de milieu quotidiens. Entre les jours 6 et 9 après l'induction, les cellules ont été récoltées en cellules uniques avec Accutase™, transférées dans un milieu DMEM/F12, centrifugées à 200 g pendant 5 minutes, resuspendues dans le milieu STEMdiff™ SMADi contenant 10 mM de Y-27632, puis repiquées dans des plaques recouvertes de Matrigel à une densité de 270 000 cellules/cm² et maintenues dans des conditions d'incubation identiques pour 5 jours supplémentaires. Les cellules ont ensuite été repassées une dernière fois selon la même procédure. Cinq jours après le dernier passage (entre 16 et 19 jours post-induction), les cellules différenciées ont été récoltées en cellules uniques avec Accutase™, centrifugées à 200 g pendant 5 minutes, puis resuspendues dans le milieu STEMdiff™ Neural Progenitor et ensemencées dans des plaques recouvertes de Matrigel à une densité de 125 000 cellules/cm². Les cellules ont été incubées à 37°C avec 5% de $CO_2$, avec des changements de milieu quotidiens, et repassées avec Accutase™ lorsque leur confluence atteignait 80 à 90%.

*Génération des NPCs-iNGN2*

Les constructions pLV-Puro-TRE3G-NGN2 et pLV-EF1a-Tet3G:IRES ont été conçues et achetées chez VectorBuilder. Au jour 0, le lentivirus a été ajouté dans du STEMdiff™ Neural Progenitor Medium frais contenant de la polybrène (8 mg/ml, Sigma). La sélection des cellules transduites a commencé au jour 1 par l'ajout de généticine (250 µg/ml) et de puromycine (2 µg/ml) dans du milieu STEMdiff™ Neural Progenitor Medium frais. Au jour 2, le milieu a été remplacé en maintenant les mêmes concentrations de généticine et de puromycine. Aux jours 3, 4 et 5, la concentration de puromycine a été réduite à 1 µg/ml pour éviter une toxicité excessive. La population de cellules transduites de manière stable a été maintenue dans du milieu STEMdiff™ Neural Progenitor et repassée avec Accutase™ lorsque la confluence atteignait 80-90%.

*Différenciation Neuronale*

Un total de 20 000 cellules par puits (MW24) ont été ensemencées avec du mTeSR+ Rock inhibitor (1:1000 ou 10 µg/ml) et de la doxycycline (1:2500 ou 4 µg/ml). Le jour 1, le milieu a été remplacé par du milieu N2. Le jour 3, le milieu a été remplacé par un milieu contenant du B27 et de l'AraC, suivi d'un remplacement de la moitié du milieu trois fois par semaine avec du

milieu B27 sans AraC. Il est recommandé d'utiliser du laminine (1:1000) une fois par semaine. Les neurones humains différenciés ont été utilisés pour les expériences dans les 14 jours suivant la différenciation.

### Transduction virale

Les neurones ensemencés ont été transduit après 1 à 4 jours *in vitro* (DIV1-4) avec les lentivirus (LV) suivant ou des virus adéno-associés (AAV) suivant :

- Pour la transduction des neurones corticaux pour l'expression de la GFP : LV.PKG.GFP(pRRLSIN.cPPT.PKG-GFP.WPRE plasmid Addgene12252).
- Pour la transduction des vésicules de BDNF : LV.CMV.BDNF-mCh (Hinckelmann et al. 2016)

Pour cela, une solution est préparée en mélangeant V1 = 10 fois le nombre de compartiments à ensemencer + 1 µL de milieu de culture, dans laquelle est ajoutée une quantité de virus définie par V2 = V1 x 0,25 µL du virus requis. Dans chaque puce, le milieu est retiré doucement sans assécher les puits des compartiments requis, puis remplacé par la solution contenant les virus. Après 24 heures, le milieu contenant le virus est remplacé par du milieu de culture, en faisant circuler cinq fois du milieu neuf dans les puces.

### Immunomarquages & Imagerie confocale

Après 18 jours en culture (DIV10) les neurones ont été fixé en utilisant une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% avec 4% de saccharose dans du PBS. Pour assurer une bonne diffusion de la solution de PFA dans les puces, 5 µl de milieu de culture sont retiré des puits et 5 µl de solution PFA est rajouté dans les puits opposé créant un flux dans les chambres compartimentalisé. Cette opération est répétée toutes les 5minutes à température ambiante jusqu'à ce que le milieu des puces ai été entièrement remplacé par la PFA. Les chambres sont ensuite méticuleusement lavées en utilisant plusieurs rinçages au PBS.
Une solution de blocage contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA), Triton 100X 0,1% et 2% de serum d'âne (Donkey Serum) dans du PBS est injecté dans tous les puits des puces laissé pendant 1 heure à température ambiante. Une solution de 1% de BSA, 0,1% de triton 100X

dans du PBS et les anticorps primaires anti-GFP (Chicken/IgY A10262, 1/1000) et/ou anti-MAP2 (Chicken/IgY ab5392, 1/1000), B3 tubulin (mouse 1/500), 1/1000), Vglut2 (Guinea 1/1000), GAD67 (mouse 1/1000), Syn (rabbit 1/1000) et PSD95 (mouse 1/1000) et une sonde Phalloïdines 647nm (In vitro A30107 1/10000) ont été injectés dans les chambres et laissé à incuber toute la nuit à 4°C. Après un lavage méticuleux au PBS Les anticorps secondaires fluorescents appropriés ont ensuite été injectés et incubés pendant 1 heure à température ambiante. Une derniere étape de lavage au PBS a été réalisé avant d'imager les cellules. L'immunofluorescence a été conservée dans du PBS pendant un maximum d'une semaine, dans l'obscurité, à 4 °C avant les acquisitions en confocal. Les immunomarquages ont été acquis avec un objectif ×10 (0,3 NA) et x60 (1,49 NA) en utilisant un microscope confocal inversé (Eclipse Ti2, Nikon) couplé à un système confocal à disque tournant (CSU-W1, Yokogawa) connecté à une caméra sCMOS à champ large (Orca-Fusion BT, Hammamatsu).

### Vidéo-microscopie sur cellules vivantes

Les enregistrements en direct des vésicules de BDNF dans les canaux, ont été réalisés à l'objectif x60 (1,4 NA) avec une acquisition toutes les 200ms pendant 30 secondes, en utilisant un microscope confocal inversé (Eclipse Ti2, Nikon) couplé à un système confocal à disque tournant (CSU-W1, Yokogawa) connecté à une caméra sCMOS à champ large (Orca-Fusion BT, Hammamatsu).

# Principaux résultats et discussions de l'étude 2

Le système MAARS a été conçu pour répondre aux défis liés à l'automatisation, la reproductibilité, la facilité d'utilisation, et la versatilité des organes-sur-puce grâce à l'intégration de plusieurs modules ; une station fluidique, un module de distribution microfluidique et des puces multiplexées. La plateforme permet la perfusion contrôlée de multiples solutions dans des compartiments neuronaux. Les tests de validation ont démontré la capacité du système à réaliser des perfusions précises et reproductibles, répondant ainsi aux attentes des utilisateurs en termes de multiplexage et d'intégration avec les systèmes d'analyse déjà présents dans les laboratoires. De plus, les microvalves pneumatiques utilisées dans le module de distribution permettent un contrôle fluide précis, réduisant les risques de contamination croisée. En résumé, le prototype de la plateforme MAARS développé ouvre de nouvelles possibilités pour le criblage à haut débit et l'étude de mécanismes biologiques, tout en restant compatible avec les infrastructures existantes, offrant ainsi une approche standardisée de l'utilisation des organes-sur-puces pour la recherche pharmaceutique et biomédicale.

### *Caractérisation des microvalves pneumatiques*

Les microvalves développé pour le système MAARS jouent un rôle crucial dans la régulation du passage des fluides dans les canaux microfluidiques de la puce multiplexée. Lors des tests, plusieurs géométries de microvalves ont été étudiées pour optimiser leur fonctionnement. Les essais ont révélé que les microvalves de 1000 µm de diamètre, associées à une membrane de 150 µm d'épaisseur, offraient des résultats satisfaisant en termes de contrôle du débit fluidique. Ces microvalves permettent des débits allant jusqu'à 100 µL/min, avec une grande précision de fermeture et d'ouverture des canaux. Cependant, certains défis subsistent, notamment l'adhésion indésirable des membranes après plusieurs cycles d'utilisation, nécessitant un étalonnage préalable pour garantir leur bon fonctionnement, ce qui n'est pas acceptable pour une industrialisation. Malgré ces limitations, les microvalves pneumatiques

ont prouvé leur efficacité dans le contexte de la distribution fluidique automatisée, permettant d'obtenir des résultats robustes et reproductibles. Des améliorations technologiques sont nécessaires pour l'évolution vers des prototypes plus industrialisables, notamment sur le choix du matériau de la membrane déformable.

### *Multiplexage de la puce et versatilité de la plateforme*

Un aspect clé de la plateforme MAARS est sa versatilité, défini la capacité à s'adapter à différentes configurations de puces grâce à un multiplexage optimisé, rendue possible grâce à une stratégie de multiplexage et une architecture optimisée des chemins fluidiques. Pour permettre l'adaptation à différents designs de puces, une matrice d'adressage a été développée, permettant de contrôler indépendamment les points d'entrée et de sortie des fluides sur chaque design de puce. Cette matrice repose sur une grille de points coniques de perfusion, espacés de 3 mm, qui maximisent les options de connexion. Grâce à cette matrice, il est possible de connecter et de contrôler différentes architectures de puces sur la même plateforme, ce qui offre une flexibilité pour l'utilisation de la plateforme MAARS pour différent organes-sur-puces. L'optimisation des chemins fluidiques a été facilitée par un algorithme spécialement conçu pour la plateforme (https://github.com/PoinsotM/Code). Cet algorithme permet de générer automatiquement les trajets les plus courts et efficaces pour les fluides entre les points d'entrée et de sortie, minimisant ainsi les singularités comme les coudes qui peuvent entraîner des pertes de pression ou la formation de microbulles. L'algorithme prend également en compte la possibilité d'inclure des obstacles fluidiques (sélectionnés par l'utilisateur), garantissant ainsi une architecture fluide parfaitement adaptée à chaque puce. Cette approche permet non seulement de maximiser le débit, mais aussi de garantir la précision des injections dans des compartiments spécifiques. Cette stratégie assure donc que la plateforme MAARS peut être utilisée pour un large éventail d'applications biologiques, avec une interopérabilité entre différents types de puces et d'expériences, sans avoir à reconfigurer manuellement le système à chaque fois.

Le système permet l'intégration de plusieurs organes-sur-puces simultanément, en respectant un format compatible avec les microscopes standards (format de plaque 96 puits). Ce multiplexage est assuré par un système d'interconnexion, système de distribution-PDMS, qui permet de perfuser chaque compartiment de l'organe-sur-puce spécifiquement. En utilisant

l’algorithme développé nous avons pu intégrer un design à huit répétitions de motifs du cerveau sur puce de l’étude 1 dans la puce multiplexée. Ce système offre un potentiel pour la recherche en biologie cellulaire et pour les tests de nouveaux composés dans le développement pharmaceutique, en permettant des expériences à grande échelle tout en maintenant une précision expérimentale élevée. Le défi principal était de garantir l’étanchéité de cette connexion, tout en maintenant la compacité et la modularité de la plateforme. Actuellement l’étanchéité reste un point critique à adresser dans les futurs prototypes de la plateforme MAARS pour évoluer vers une industrialisation.

### *Preuve de concept*

Nous avons présenté dans les résultats l'application de la plateforme MAARS pour l'immunomarquage automatisé de cultures neuronales à partir de progéniteurs murins et humains. Ce procédé, qui consiste à appliquer successivement des anticorps primaires et secondaires afin d'identifier des marqueurs spécifiques, a été réalisé sur des cultures de progéniteurs neuronaux humains ainsi que sur des cultures neuronales primaires de rats. Grâce à la capacité du système MAARS à gérer jusqu'à huit solutions simultanément, plusieurs marquages ont pu être effectués dans les mêmes conditions expérimentales, garantissant une distribution homogène des réactifs et permettant ainsi la réalisation simultanée des immunomarquages d'intérêt de manière entièrement automatisée. Cela démontre l'efficacité et la reproductibilité du système. Ce résultat met en lumière le potentiel de la plateforme à automatiser des processus complexes de préparation d'échantillons, tout en assurant une qualité d'analyse comparable à celle des méthodes manuelles, qui sont plus laborieuses et chronophages. Un logiciel dédié pourrait rendre le processus d’immunomarquage complètement autonome, libérant ainsi l’utilisateur tout en garantissant la réussite de la manipulation. D'autres preuves de concept seront nécessaires pour démontrer l'intérêt de la plateforme MAARS dans différentes applications. Avec l'essor des cellules souches humaines, une automatisation des protocoles de différenciation et de maintien des cultures constituerait un ajout de valeur considérable. De plus, l’utilisation de la plateforme MAARS pour l'administration automatique de traitements pharmacologiques bien établis prouverait sa valeur pour une intégration dans les études précliniques.

Pour Conclure, le prototype de la plateforme MAARS développé permet déjà de répondre : 1) au multiplexage, grâce à la possibilité de multiplexer le design de l'organe sur puce d'intérêt pour l'étude à réaliser ; 2) à la versatilité des applications, avec la conception d'une matrice de distribution et l'ensemble des stratégies permettant de concevoir différentes couches de distribution fluidique adaptées aux designs des puces multiplexées ; 3) à l'automatisation de la distribution fluidique, grâce à la caractérisation de la stratégie de contrôle de cette distribution ; 4) à la facilité d'utilisation via le logiciel OxyGEN$^{TM}$. Une demande de brevet a été déposée en novembre 2023 pour la plateforme MAARS.

Il reste toutefois de nombreux développements techniques et des choix à faire pour permettre à la plateforme de gagner en intégration et de s'orienter vers une potentielle industrialisation. Les efforts doivent principalement se concentrer sur l'amélioration et la standardisation du module de distribution, qui représente l'innovation majeure de la plateforme.

# 7 Discussion générale et conclusion

## Les cerveaux sur puces : Des outils de reconstruction des réseaux neuronaux

Les cerveaux sur puces s'imposent comme des outils technologiques essentiels pour la modélisation *in vitro* des réseaux neuronaux. En s'appuyant sur des concepts issus des études de connectomiques, ces plateformes permettent de créer des compartiments distincts reliés par des microcanaux, facilitant ainsi la compartimentation des populations neuronales et de leurs projections pour construire des réseaux neuronaux directionnels. L'un des avantages clés des cerveaux sur puces est la capacité à manipuler de manière précise et spécifique les populations neuronales ou leurs projections grâce à une compartimentation des fluides à l'échelle micrométrique. De plus, la flexibilité dans la conception des dispositifs permet non seulement une structuration fine des réseaux neuronaux, mais aussi un contrôle spatial rigoureux des sites de connexions synaptiques entre les différentes populations.

Pour reproduire sur puce le réseau cortico-striatal, nous avons choisi d'utiliser le PDMS (polydiméthylsiloxane) en raison de ses propriétés biocompatibles, de sa transparence et de sa grande perméabilité aux gaz, garantissant ainsi une viabilité prolongée des cultures neuronales. De plus, son élasticité permet de concevoir des structures flexibles et faciles à manipuler. Enfin, son utilisation est peu coûteuse et moins complexe à mettre en œuvre dans les laboratoires par rapport à d'autres méthodes de microfabrication mentionnées dans le **chapitre 2.3.2**. Il serait cependant intéressant d'explorer d'autres techniques de fabrication, telles que la fabrication stratifiée, pour surmonter certaines limites du PDMS, notamment son absorption non spécifique de molécules. Dans notre étude, n'avons pas utilisé de composés susceptibles d'être absorbé par le PDMS.

En nous basant sur l'architecture des projections cortico-striatales, nous avons développé un modèle de cerveau sur puce à trois compartiments avec des microcanaux unidirectionnels, afin de modéliser un réseau cortico-striatal topographiquement organisé. Les projections de deux aires corticales distinctes sont respectivement dirigées vers des régions spécifiques et ségréguées du striatum, permettant ainsi de créer des zones de projections spécifique à chaque cortex, avec une absence de recouvrement dans le striatum. Ce dispositif a permis de caractériser structurellement et fonctionnellement la formation d'un

réseau neuronal ségrégé, reproduisant physiologiquement l'organisation topographique et unidirectionnelle des projections des neurones corticaux vers le striatum. L'outil cerveau-sur-puce que nous avons développé, s'ajoute aux modèles existants de réseau cortico-striatal sur puce en intégrant une dimension topographique des projections, permettant également d'étudier les modifications de cette organisation lors de modifications plastiques ou d'altérations pathologiques du réseau.

Cependant, il est important de reconnaître que les réseaux neuronaux reconstruits dans des chambres microfluidiques demeurent des modèles simplifiés par rapport à ceux observés *in vivo*. Par exemple, bien que nous ayons pu observer des astrocytes GFAP-positifs dans l'ensemble de nos compartiments neuronaux, facilitant ainsi la formation de synapses tripartites, d'autres types cellulaires essentiels, tels que la microglie et les oligodendrocytes, étaient absents. Or, ces cellules jouent un rôle clé dans la régulation de la myélinisation, la croissance axonale, ainsi que dans la synaptogenèse et la maturation des synapses. Par conséquent, l'absence de ces éléments limite la complexité des réseaux modélisés sur puce. Il pourrait être pertinent d'envisager l'ajout de progéniteurs d'oligodendrocytes, comme cela a déjà été réalisé dans une étude (Bijland et al. 2019), afin d'examiner les évolutions structurelles et fonctionnelles des réseaux neuronaux, notamment en ce qui concerne les modifications des projections myélinisées dans des contextes de plasticité ou de pathologies. De plus Les neurones dopaminergiques D1 et D2 jouent un rôle fondamental dans la plasticité synaptique du réseau corticostriatal. La dopamine, en se liant aux récepteurs D1 et D2 présents sur les neurones épineux moyens du striatum, module la capacité des synapses à se renforcer ou à s'affaiblir, processus crucial dans l'adaptation et la réorganisation des circuits neuronaux (Surmeier et al. 2007). Cette modulation de la plasticité est également cruciale pour la réorganisation fonctionnelle des circuits corticostriataux, permettant un remodelage synaptique dans des conditions pathologiques ou à la suite de dommages neuronaux, notamment dans la maladie de Parkinson (Piccoli, et Calabresi 2012). L'étude des interactions entre les récepteurs D1 et D2 dans les modèles de cerveau sur puce pourrait offrir une approche pertinente sur la manière dont ces récepteurs influencent non seulement la fonction du réseau, mais aussi sa structure et sa capacité à s'adapter, notamment dans des conditions pathologiques.

Bien que ces améliorations puissent accroître la pertinence physiologique des dispositifs pour la reproduction du réseau corticostriatal sur puce, il est essentiel de rappeler que les cerveaux sur puces doivent rester des solutions minimalistes, simples mais extrêmement informatives. Ils doivent être utilisés en complément des modèles *in vivo*, afin de fournir une représentation plus précise des réponses des circuits neuronaux face aux perturbations génétiques ou environnementales. Ces dispositifs ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude de la formation et de la réorganisation des réseaux neuronaux, ainsi que pour le développement de neurothérapies. Ils constituent des plateformes efficaces pouvant être utilisées comme outils de présélection, en complément des études *in vivo* et de l'imagerie humaine, offrant un modèle réduit mais pertinent pour l'analyse des dynamiques neuronales.

### Étude du développement aberrant du réseau corticostriatal sur puce à la suite d'une hyperactivité corticale

Les cerveaux sur puces étant des outils pertinents pour la modélisation des réseaux neuronaux organisés topographiquement, nous avons utilisé la plateforme développée pour étudier les mécanismes sous-jacents aux dysfonctionnements du réseau corticostriatal dans des conditions d'hyperactivité neuronale. L'hyperactivité neuronale, associée à une désorganisation des circuits corticostriataux, est l'une des caractéristiques majeures de nombreux troubles neurodéveloppementaux et psychiatriques, tels que l'autisme, la schizophrénie et le trouble bipolaire (Shepherd 2013; Wolfram et Baines 2013; Nelson et Kreitzer 2014). Ces perturbations neuronales entraînent une altération de la connectivité fonctionnelle au sein des réseaux cérébraux, affectant à la fois le développement des circuits et les réponses comportementales. Dans notre étude, nous avons ciblé le canal potassique Kir2.1, dont la mutation AAA est souvent liée à des formes d'hyperexcitabilité corticale. Cette hyperexcitabilité a été associées à des dysfonctionnements neuronaux dans des pathologies comme le trouble bipolaire, la schizophrénie et les troubles du spectre autistique (Sicca et al., 2011; Imbrici et al., 2013; Ambrosini et al., 2014; Binda et al., 2018).

En introduisant la mutation spécifique du Kir2.1, où le motif GYG de la région du pore est remplacé par trois alanines (Kir2.1AAA) (Preisig-Müller et al. 2002), appliquée aux progéniteurs des neurones corticaux nous avons provoqué une hyperexcitabilité des neurones corticaux, entraînant une réorganisation significative du circuit cortico-striatal.

L'hyperactivité corticale a conduit à une augmentation de la densité des projections dans la chambre striatale et à l'invasion de la zone de non-recouvrement, qui restait en condition contrôle exempte de projections. Bien que l'activité individuelle des neurones n'ait pas changé, cette hyperexcitabilité a généré des nœuds de convergence dysfonctionnels, perturbant l'organisation topographique des projections et provoquant une perte de la ségrégation entre les aires corticales. Ces résultats illustrent l'impact de l'hyperactivité corticale sur la structure des réseaux neuronaux, démontrant comment des déséquilibres d'excitabilité peuvent altérer l'organisation fonctionnelle des projections dans le striatum. Cette réorganisation anormale pourrait être lié des symptômes observés dans des pathologies comme l'autisme et la schizophrenie, où la connectivité cérébrale est compromise. Surtout, l'utilisation de notre plateforme cerveau-sur-puce a permis un suivi précis et longitudinal de l'évolution du réseau et de ces altérations fonctionnelles et structurales.

À partir de ces observations, nous pouvons formuler plusieurs hypothèses concernant l'impact de l'hyperactivité neuronale sur la plasticité des réseaux. À l'échelle cellulaire, l'hyperactivité induite par la mutation Kir2.1$^{AAA}$ entraîne une surconnectivité locale, tandis qu'à l'échelle du réseau, elle provoque une désorganisation topographique et une perte de la spécificité des projections axonales. Ces nœuds aberrants pourraient cependant conserver une certaine fonctionnalité, indiquant que la plasticité neuronale peut compenser partiellement ces déséquilibres, bien que cela résulte en des circuits cérébraux moins efficaces. Nous avons observé ces changements jusqu'à 21 jours après la culture (DIV21), mais des études plus longues pourraient révéler des dynamiques supplémentaires dans la réorganisation des circuits, notamment en ce qui concerne leur stabilisation potentielle et leur réorganisation lié au coût métabolique associé à leur maintien. Il serait également pertinent d'induire de l'hyperactivité dans une seule des deux chambres corticales afin d'étudier comment une seule région hyperactive altère la modification du réseau en prenant en compte la compétition synaptique avec l'autre population corticale non hyperactive.

Au-delà des pathologies psychiatriques liées à l'hyperactivité, il est important de noter que la plasticité des réseaux peut également être affectée par une modulation de l'activité corticale. Par exemple, dans le système visuel, des études sur des sujets entraînés à jongler ont montré un remodelage structurel significatif de la matière blanche, suggérant des reconnections sélectives dans les circuits corticaux (Draganski et al. 2004; Scholz et al. 2009).

De même, un réarrangement extensif des circuits cérébraux après des années d'entraînement intensif est également associé aux compétences exceptionnelles des pianistes professionnels (Bengtsson et al., 2005) qui pourraient être exploré en utilisant notre plateforme. Enfin, dans notre étude, nous avons modélisé l'hyperactivité corticale, mais il est important de noter que l'induction d'une hypoactivité, en particulier via la surexpression du canal potassique Kir2.1 dans sa version « sauvage », a montré des effets tout aussi perturbateurs sur le développement des réseaux neuronaux. Des études ont révélé que l'hypoactivité entraîne une réduction de la croissance et de la ramification des axones corticaux, avec des projections axonales qui s'étendent au-delà de leurs zones cibles sans former de connexions stables (Wang et al., 2007). Ces aberrations peuvent être liées à une perte de l'équilibre entre l'activité pré- et post-synaptique, équilibre essentiel dans le réseau corticostriatal pour établir des connexions fonctionnelles. Dans ce réseau, les neurones épineux moyens GABAergiques du striatum sont électriquement silencieux (Nisenbaum et Wilson 1995; Wilson et Kawaguchi 1996), et leur activité dépend fortement de l'activité présynaptique des neurones corticaux pour établir des connexions robustes. En cas d'hypoactivité présynaptique, les axones peuvent continuer à croître, mais les connexions qui en résultent sont mal formées et instables, perturbant ainsi l'organisation des circuits neuronaux.

Notre modèle de cerveau sur puce est donc adapté à l'analyse longitudinale des perturbations neurodéveloppementales, telles que l'hyperactivité ou l'hypoactivité neuronale, en permettant de suivre en temps réel la réorganisation des réseaux corticaux et striataux. Ces résultats sont particulièrement pertinents pour les connectopathies neurodéveloppementales, où l'hyperactivité dans certaines régions corticales ou striatales peut conduire à une expansion aberrante des projections. Cela ouvre également des perspectives sur l'étude de thérapies ciblées visant à corriger ces déséquilibres dans des régions spécifiques (Steinberg et al. 2015).

## Les cerveaux-sur-puces : Plateformes minimalistes pour analyser les circuits neuronaux et devenir des modèles précliniques pour l'investigation de traitements

Ayant démontré la pertinence des modèles cerveaux-sur-puces pour l'étude des perturbations neurodéveloppementales affectant le réseau cortico-striatal, il est essentiel de s'interroger sur leur rôle en tant que plateformes minimalistes et modèles précliniques pour l'investigation de traitements. Les cerveaux-sur-puces sont déjà largement utilisés pour modéliser diverses maladies, notamment les maladies neurodégénératives, comme mentionné dans le **chapitre 3.2.1.1**. Concernant les troubles psychiatriques, les traitements actuels, bien qu'utiles, n'apportent souvent qu'un soulagement modéré des symptômes et ne modifient pas l'évolution des troubles sous-jacents. La majorité de ces médicaments ont été développés sur la base d'observations cliniques empiriques, laissant encore des zones d'ombre quant à la manière dont ils influencent les circuits neuronaux (Hyman 2012). Intervenir de manière ciblée pendant des périodes critiques du développement pourrait être la méthode la plus efficace pour modifier l'évolution de ces troubles (Krol et Feng 2018). Compte tenu des changements dynamiques dans les synapses et la connectivité au cours du développement, des interventions précoces pourraient favoriser un développement neuronal normal et offrir des bénéfices durables. Les résultats de la première étude de ce travail de thèse soulignent la nécessité de repenser les approches actuelles en matière de conception de traitements. Des interventions ciblées, pourraient offrir des thérapies plus efficaces, en particulier pour les pathologies caractérisées par des réseaux hyperactifs et anormaux (Steinberg et al., 2015). Les thérapies de nouvelle génération devraient ainsi viser des circuits neuronaux spécifiques, en ciblant notamment les nœuds de convergence dysfonctionnels. Ces traitements pourraient inclure des approches pharmacologiques, mais aussi des stimulations électriques ou optiques, permettant de moduler précisément les régions cérébrales affectées. Pour développer ces thérapies, il est essentiel de comprendre en profondeur les mécanismes qui régissent la connectivité neuronale, particulièrement dans les troubles présentant des composantes développementales. C’est dans ce cadre que les modèles cerveaux-sur-puces, reproduisant des réseaux neuronaux complexes, s’avèrent pertinents en tant que plateformes *in vitro* uniques pour faire avancer le développement de thérapies ciblées. Ils permettent une manipulation sélective des populations neuronales et une observation directe des dynamiques de connectivité tout au long du développement, facilitant ainsi la conception de traitements plus précis et efficaces.

Cependant, malgré leur efficacité et leur reproductibilité, les cerveaux-sur-puces actuels présentent certaines limitations, notamment en ce qui concerne leur déploiement à grande échelle. La production en grande quantité de ces dispositifs est un défi majeur, car de nombreuses approches actuelles sont souvent "faites maison", développées de manière artisanale dans des laboratoires de recherche. Ces procédés manuels, bien qu'efficaces pour des expérimentations à petite échelle, sont lents et laborieux, ce qui empêche la fabrication d'un grand nombre d'échantillons standardisés. Cette absence de standardisation rend difficile la démocratisation des cerveaux-sur-puces dans des contextes industriels ou pharmaceutiques, où des volumes de données importants sont nécessaires pour valider les résultats. Sans une production stable à grande échelle, il est impossible d'intégrer ces dispositifs dans les chaînes de développement thérapeutique, qui nécessitent des plateformes capables de générer des données fiables et reproductibles en grande quantité limitant ainsi, pour le moment, le rôle des cerveaux-sur-puces à des études biologiques.

### Démocratisation de la technologie organe-sur-puce

Après avoir exploré le potentiel des cerveaux-sur-puces en tant que modèles précliniques pour l'investigation des traitements, il est essentiel de discuter de la manière dont les organes-sur-puces peuvent réussir leur transition vers une utilisation industrielle dans le développement pharmaceutique. Bien qu'innovants, ces dispositifs doivent encore relever plusieurs défis évoqués dans le **chapitre 2.6.2** pour être pleinement intégrés dans le pipeline pharmaceutique, notamment en matière de standardisation et de mise à l'échelle. Ces deux aspects sont cruciaux pour répondre aux exigences de l'industrie, qui requiert des plateformes fiables, faciles à utiliser, capables de traiter des échantillons en grand nombre, tout en garantissant la robustesse et la reproductibilité des résultats.

Une étape clé où les organes-sur-puces peuvent jouer un rôle fondamental est la lead optimization, qui consiste à affiner les composés médicamenteux avant leur entrée en phase clinique. Durant cette phase, il est essentiel d'évaluer non seulement l'efficacité des composés, mais aussi leur impact fonctionnel sur les tissus et les organes. Les modèles d'organes-sur-puces offrent ici des données fonctionnelles précises, permettant de mieux comprendre l'impact des composés dans des conditions physiologiques humaines contrôlées.

Pour que les tests précliniques sur organes-sur-puces soient adoptés à grande échelle, il est indispensable de développer des plateformes automatisées qui standardisent les protocoles et facilitent les expérimentations. Ces plateformes doivent permettre des tests à haut débit, intégrant des modules automatisés pour la gestion des fluides et la multiplication des échantillons, réduisant ainsi le risque d'erreurs humaines et augmentant la productivité. C'est dans cette optique que nous avons développé le prototype de la plateforme MAARS répondant à ces critères. Les tests de validation ont montré que ce système permet de réaliser des perfusions précises et reproductibles dans les compartiments neuronaux, grâce à des microvalves pneumatiques qui assurent un contrôle fin des flux et minimisent les risques de contamination croisée. La plateforme MAARS se distingue des autres systèmes existants grâce à son automatisation avancée et sa versatilité, permettant d'effectuer de nombreuses d'expérimentations tout en restant compatible avec les infrastructures existantes dans les laboratoires. En comparaison avec d'autres plateformes, qui peuvent nécessiter des investissements conséquents par leur maque de compatibilité avec d'autres systèmes ou présenter des limitations en termes d'automatisation MAARS offre une et adaptable et autonome. En plus de ses capacités de contrôle précis, elle permet une multiplication des tests, répondant ainsi aux exigences croissantes de l'industrie pharmaceutique pour les besoins de criblage en lead optimisation.

Néanmoins, bien que fonctionnelle, la plateforme MAARS nécessite encore de nombreuses améliorations et preuves de concept pour être pleinement validé. Il reste nécessaire de tester la plateforme dans des conditions expérimentales variées et de l'appliquer à d'autres types de tissus ou d'organes, afin de démontrer sa pertinence pour divers domaines et thérapies.

Toutefois, une standardisation excessive pourrait ne pas toujours être adaptée. Bien qu'elle soit cruciale pour garantir des résultats reproductibles à grande échelle, il est également essentiel de conserver une certaine flexibilité pour répondre aux besoins spécifiques des chercheurs et des cliniciens, notamment lorsqu'il s'agit d'investiguer des mécanismes précis. Un compromis serait de développer des solutions simples mais bien validées, avec des preuves de concept solides, comme l'a montré l'étude *de Ewart et al*. sur la puce hépatique humaine de Emulate, qui a pu prédire avec succès 87 % des toxicités hépatiques non détectées dans les tests animaux, tout en obtenant une spécificité de 100%

empêchant l’apparition de faux positif (Ewart et al. 2022). Ce type de validation démontre le potentiel des organes-sur-puces à remplacer les modèles animaux traditionnels, particulièrement dans la phase de lead optimisation du développement de médicaments. La collaboration entre ingénieurs, biologistes et cliniciens sera essentielle pour garantir que ces systèmes puissent être personnalisés et adaptés aux besoins spécifiques de chaque étude, tout en contribuant à l’évolution de la recherche thérapeutique.

Pour conclure, il semble que les deux grandes opportunités que représentent les organes-sur-puces à l'avenir se situent dans le domaine de la lead optimisation pour le développement de médicaments et de la médecine personnalisée. Grâce à l'intégration de plateformes microfluidiques utilisant des cellules dérivées de patients, il est désormais possible de modéliser des maladies à l'échelle individuelle, notamment dans le traitement du cancer. Par exemple, les modèles de tumeurs-sur-puce permettent de recréer l'environnement microtumoral spécifique du patient, ce qui facilite les tests de sensibilité aux médicaments en temps réel. Ces modèles ont montré leur capacité à reproduire fidèlement les réponses des patients aux traitements anticancéreux, permettant ainsi d'identifier plus rapidement les thérapies les plus efficaces tout en minimisant les effets secondaires (Yu, Zhou, et Cao 2023). Il faudra suivre de près les évolutions en termes de standardisation du domaine pour comprendre comment les organes-sur-puces peuvent réussir leur démocratisation.

## Conclusion

Tout au long de ce travail de thèse, nous avons utilisé une approche *in vitro* basée sur les cerveaux-sur-puces pour modéliser l'organisation topographique du réseau cortico-striatal. Nous avons démontré que l'hyperexcitabilité corticale entraîne une réorganisation anormale des projections neuronales, augmentant la densité des connexions et perturbant l'organisation topographique des projections vers le striatum. Ces résultats sont particulièrement pertinents pour la compréhension des troubles neurodéveloppementaux, tels que l'autisme et la schizophrénie, où des déséquilibres d'excitabilité perturbent la connectivité cérébrale. Cette plateforme offre ainsi un cadre précieux pour étudier en profondeur les mécanismes sous-jacents et explorer des traitements potentiels.

En complément, afin de standardiser et démocratiser l'utilisation des organes-sur-puces, nous avons développé le prototype de la plateforme **MAARS**, un module de distribution microfluidique permettant des expérimentations multiplexées, automatiques et polyvalentes. Cette avancée ouvre de nouvelles perspectives pour le transfert de la technologie organes-sur-puces vers une utilisation plus large, notamment dans l'industrie pharmaceutique.

# Annexes

## Table des ressources

| REAGENT or RESOURCE | SOURCE | IDENTIFIER |
|---|---|---|
| **Antibodies** | | |
| Anti-GFP | Life (chicken) | A10262 |
| Anti-RFP | Thermo Fisher | MA5-15257 |
| βIII-Tubulin | BioLegend | BioLegend #801202 |
| Anti-MAP2 | abcam | ab 5392 |
| Anti-GFP2 | Sigma | A11122 |
| Anti-VGlut2 | MerkMillipore | MerkMillipore #AB2251 |
| Anti-GAD67 | Chemicon | Chemicon #MAB5406 |
| Anti-Synaptophysin | Abcam | AB14692 |
| Anti-PSD-95 | MerkMillipore | MAB1598 |
| Phalloidines | Invitrogen | A30107 |
| **Plasmid and virus** | | |
| pENN.AAV.CamKII.GCaMP6f.WPRE.SV40(). | Addgene | Addgene100834-AAV9 |
| LV.PKG.GFP(pRRLSIN.cPPT.PKG-GFP.WPRE) | Addgene | Addgene12252-Plasmid |
| pCAG-kir2.1Mut-T2A-tdTomato | Addgene | Addgene60644-Plasmid |
| LV.CMV.BDNF-mCh | (Hinckelmann et al. 2016) | |
| | | |
| **Chemicals** | | |
| Poly-D-lysine | Sigma | P6407-5mg |
| Laminine | Thermo Fisher | 23017015 |

| | | |
|---|---|---|
| Neurobasal | Thermo Fisher | 21103049 |
| B27-supplement | Thermo Fisher | A3582801 |
| Glutamine | Thermo Fisher | 25030081 |
| pénicilline/streptomycine | Thermo Fisher | 15070063 |
| Trichloro Silane | Sigma | 448931-10G |
| Tetrodotoxin citrate | Biotechne | 1069 |
| | | |
| **Critical commercial assays** | | |
| Epoxy | Soloplast | R123 |
| Sykgard 184 | Dow Corning | 1673921 |
| FluoroDish™ | Thermofisher scientific | FD35-100 |
| Lonza Nucleofactor™ 1/11/2b | Lonza | VG-1001 |
| | | |
| **Experimental models: Cell lines** | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| **Experimental models: Organisms/strains** | | |
| | | |

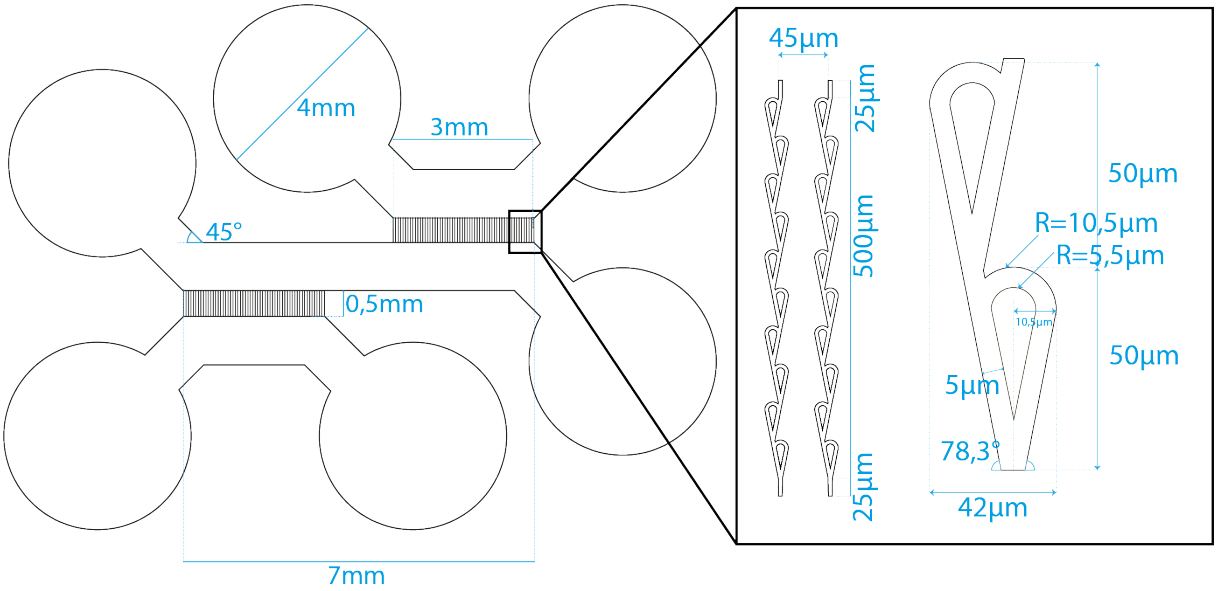



*Figure supplémentaire 1 -Schéma détaillé du design de la puce de l'étude 1 avec des canaux teslavalve et une NO go zone de taille 1000µm.*

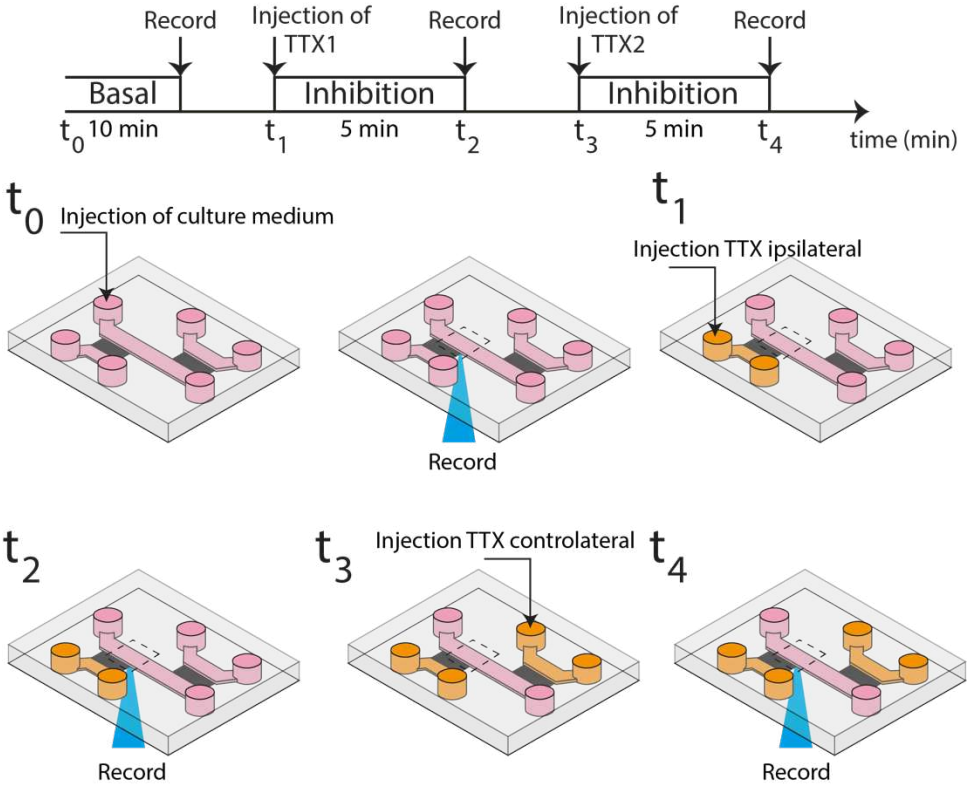



*Figure supplémentaire 2 : Description détaillée du protocole d'injection et d'enregistrement de l'activité calcique du striatum lors de l'inhibition du cortex avec la TTX. En rose, le milieu de culture ; en orange, la solution contenant la TTX. À t0, le milieu de culture est injecté dans le striatum pour qu'il soit en surpression par rapport aux chambres corticales, afin qu'il n'y ait pas de diffusion de la TTX à travers les microcanaux pendant l'expérience.*

## Interviews

| Pays | Nom | Date | Domaine de recherche | Années d'expérience dans le domaine des Organes-sur-puces |
|---|---|---|---|---|
| France | Sylvie Millet | 13/02/2022 | Marché de l'innovation, recherche translationnelle | 10 ans |
| Pays-Bas | Duc Phan | 25/04/2022 | Oncologie | 10 ans |
| États-Unis | Massimo Mastrangelli | 06/07/2022 | Axé sur les Organes-sur-puce pour le cerveau, cœur, intestin, et poumons | 5 ans |

Tendances du marché :

| Expert interrogé | Tendances du marché sur les 5 dernières années |
|---|---|
| Sylvie Millet | Le marché évolue certes, mais les défis restent les mêmes qu'en 2018. |
| Duc Phan | En évolution. De plus en plus d'intérêt industriel pour des organes ou tissus uniques, adaptés à des usages spécifiques. |
| Massimo Mastrangelli | Le marché est en constante augmentation et devrait croître dans les 5 à 10 prochaines années. |

Importance du niveau de criblage dans les plateformes microfluidiques d'organes-sur-puces :

| Expert interrogé | Débit élevé dans les plateformes organes-sur-puces microfluidiques | Criblage visé |
|---|---|---|
| Sylvie Millet | Le débit élevé est crucial pour les entreprises industrielles, mais dépend des applications. Les plateformes OoCs peuvent tolérer un débit relativement "faible" pour l'optimisation de molécules. | 8-16 en fonction des applications |

| Expert interrogé | Débit élevé dans les plateformes organes-sur-puces microfluidiques | Criblage visé |
|---|---|---|
| Duc Phan | L'objectif des plateformes microfluidiques OoCs est d'être un nouvel outil de découverte de médicaments et de toxicologie, notamment lors de l'optimisation des molécules. | 10-12 espérés |
| Massimo Mastrangelli | Oui, c'est important. | Débit relatif entre 8 et 12 |

Où l'intégration de plateformes microfluidiques d'organes-sur-puces est-elle nécessaire?

| Expert interrogé | Utilité des plateformes microfluidiques OoCs |
|---|---|
| Sylvie Millet | Phase préclinique - Phase I, pour évaluer la toxicité ou l'efficacité d'une molécule, notamment lors de l'optimisation des molécules. |
| Duc Phan | Optimisation des molécules prometteuses et évaluation de la toxicité. La médecine personnalisée appliquée aux OoCs est une grande promesse. |
| Massimo Mastrangelli | Criblage à haut débit avec un faible niveau de complexité et format multi-puits, pour l'optimisation des molécules. |

Importance de l'automatisation

| Expert interrogé | Automatisation dans la distribution des fluides et l'échantillonnage |
|---|---|
| Sylvie Millet | Oui, l'automatisation apporte de la répétabilité, c'est indispensable pour améliorer la robustesse. |
| Duc Phan | L'automatisation est intéressante car elle évite les interventions humaines, ce qui augmente la reproductibilité et réduit les besoins en formation. |
| Massimo Mastrangelli | L'automatisation apporte de la répétabilité, donc oui, c'est préférable à une distribution manuelle des fluides. |

Obstacles majeurs à l'adoption généralisée des organes-sur-puces par les industries pharmaceutiques

| Expert interrogé | Obstacles majeurs |
|---|---|
| Sylvie Millet | Preuve de concept comme celle d'Emulate. La principale difficulté des systèmes microfluidiques est la polyvalence et le "plug & play". |
| Duc Phan | Pertinence et robustesse des résultats pour appuyer le produit. Les régulateurs constituent également un obstacle majeur à ne pas négliger. |
| Massimo Mastrangelli | Manque de normes et de lignes directrices réglementaires ou d'approbation. Faible débit. |

Intérêt de la versatilité des plateformes organes-sur-puces ?

| Expert interrogé | Compatibilité des plateformes microfluidiques OoCs avec différents designs et types cellulaires |
|---|---|
| Sylvie Millet | Lors du développement d'un produit, il faut le conceptualiser et le concevoir pour atteindre le plus grand marché possible. Votre produit, qui semble être une distribution de fluides microfluidiques pour OoCs, bénéficie de la polyvalence et de la compatibilité avec différents designs. |
| Duc Phan | Les utilisateurs finaux ont déjà leurs questions biologiques et leurs designs, mais ne connaissent pas toujours les technologies disponibles. Une communication efficace et une plateforme adaptable à leurs besoins sont essentielles. |
| Massimo Mastrangelli | Une plateforme idéale d'organe-sur-puce devrait combiner des interfaces standardisées, une polyvalence pour différents types cellulaires et une adaptabilité aux designs OoCs pour répondre aux besoins des utilisateurs. |

# 9 Bibliographie


Abbott, N. Joan, Lars Rönnbäck, et Elisabeth Hansson. 2006. « Astrocyte–Endothelial Interactions at the Blood–Brain Barrier ». *Nature Reviews Neuroscience* 7 (1): 41-53. https://doi.org/10.1038/nrn1824.

Abd Rahman, Nurhaslina, Fatimah Ibrahim, et Bashar Yafouz. 2017. « Dielectrophoresis for Biomedical Sciences Applications: A Review ». *Sensors* 17 (3): 449. https://doi.org/10.3390/s17030449.

Ahn, Jungho, Min-Ji Yoon, Seon-Hwa Hong, Hwijae Cha, Danbi Lee, Hwa Seon Koo, Ji-Eun Ko, et al. 2021. « Three-Dimensional Microengineered Vascularised Endometrium-on-a-Chip ». *Human Reproduction* 36 (10): 2720-31. https://doi.org/10.1093/humrep/deab186.

Alexander, G E, M R DeLong, et P L Strick. 1986. « Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex ». *Annual Review of Neuroscience* 9 (1): 357-81. https://doi.org/10.1146/annurev.ne.09.030186.002041.

Allwardt, Vanessa, Alexander J. Ainscough, Priyalakshmi Viswanathan, Stacy D. Sherrod, John A. McLean, Malcolm Haddrick, et Virginia Pensabene. 2020. « Translational Roadmap for the Organs-on-a-Chip Industry toward Broad Adoption ». *Bioengineering* 7 (3): 112. https://doi.org/10.3390/bioengineering7030112.

Amartumur, Sarnai, Huong Nguyen, Thuy Huynh, Testaverde S. Kim, Ran-Sook Woo, Eungseok Oh, Kyeong Kyu Kim, Luke P. Lee, et Chaejeong Heo. 2024. « Neuropathogenesis-on-Chips for Neurodegenerative Diseases ». *Nature Communications* 15 (1): 2219. https://doi.org/10.1038/s41467-024-46554-8.

Ambrosini, Elena, Federico Sicca, Maria S. Brignone, Maria C. D'Adamo, Carlo Napolitano, Ilenio Servettini, Francesca Moro, et al. 2014. « Genetically Induced Dysfunctions of Kir2.1 Channels: Implications for Short QT3 Syndrome and Autism–Epilepsy Phenotype ». *Human Molecular Genetics* 23 (18): 4875-86. https://doi.org/10.1093/hmg/ddu201.

Andrews, Madeline G., et Arnold R. Kriegstein. 2022. « Challenges of Organoid Research ». *Annual Review of Neuroscience* 45 (1): 23-39. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-111020-090812.

Anjewierden, Douglas, Gregory A Liddiard, et Bruce K Gale. 2012. « An electrostatic microvalve for pneumatic control of microfluidic systems ». *Journal of Micromechanics and Microengineering* 22 (2): 025019. https://doi.org/10.1088/0960-1317/22/2/025019.

Annweiler, Cédric, Bernard Brugg, Jean-Michel Peyrin, Robert Bartha, et Olivier Beauchet. 2014. « Combination of Memantine and Vitamin D Prevents Axon Degeneration Induced by Amyloid-Beta and Glutamate ». *Neurobiology of Aging* 35 (2): 331-35. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.029.

Arbuthnott, Gordon W. 2014. « Thalamostriatal Synapses—Another Substrate for Dopamine Action? » In *Progress in Brain Research*, 211:1-11. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63425-2.00001-5.

Armstrong, Melissa J., et Michael S. Okun. 2020. « Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review ». *JAMA* 323 (6): 548. https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360.

Averbeck, Bruno B., Julia Lehman, Moriah Jacobson, et Suzanne N. Haber. 2014. « Estimates of Projection Overlap and Zones of Convergence within Frontal-Striatal Circuits ». *The*

*Journal of Neuroscience* 34 (29): 9497-9505. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5806-12.2014.

Azevedo, Frederico A.C., Ludmila R.B. Carvalho, Lea T. Grinberg, José Marcelo Farfel, Renata E.L. Ferretti, Renata E.P. Leite, Wilson Jacob Filho, Roberto Lent, et Suzana Herculano-Houzel. 2009. « Equal Numbers of Neuronal and Nonneuronal Cells Make the Human Brain an Isometrically Scaled-up Primate Brain ». *Journal of Comparative Neurology* 513 (5): 532-41. https://doi.org/10.1002/cne.21974.

Azizgolshani, H., J. R. Coppeta, E. M. Vedula, E. E. Marr, B. P. Cain, R. J. Luu, M. P. Lech, et al. 2021. « High-Throughput Organ-on-Chip Platform with Integrated Programmable Fluid Flow and Real-Time Sensing for Complex Tissue Models in Drug Development Workflows ». *Lab on a Chip* 21 (8): 1454-74. https://doi.org/10.1039/D1LC00067E.

Badreddine, Nagham, Gisela Zalcman, Florence Appaix, Guillaume Becq, Nicolas Tremblay, Frédéric Saudou, Sophie Achard, et Elodie Fino. 2022. « Spatiotemporal Reorganization of Corticostriatal Networks Encodes Motor Skill Learning ». *Cell Reports* 39 (1): 110623. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110623.

Baldan, A. 2012. « Adhesion Phenomena in Bonded Joints ». *International Journal of Adhesion and Adhesives* 38 (octobre):95-116. https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2012.04.007.

Balleine, Bernard W, et John P O'Doherty. 2010. « Human and Rodent Homologies in Action Control: Corticostriatal Determinants of Goal-Directed and Habitual Action ». *Neuropsychopharmacology* 35 (1): 48-69. https://doi.org/10.1038/npp.2009.131.

Bang, Seokyoung, Seung-Ryeol Lee, Jihoon Ko, Kyungmin Son, Dongha Tahk, Jungho Ahn, Changkyun Im, et Noo Li Jeon. 2017. « A Low Permeability Microfluidic Blood-Brain Barrier Platform with Direct Contact between Perfusable Vascular Network and Astrocytes ». *Scientific Reports* 7 (1): 8083. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07416-0.

Barabási, Albert-László, et Réka Albert. 1999. « Emergence of Scaling in Random Networks ». *Science* 286 (5439): 509-12. https://doi.org/10.1126/science.286.5439.509.

Bassett, Danielle S, et Edward T Bullmore. 2009. « Human Brain Networks in Health and Disease ». *Current Opinion in Neurology* 22 (4): 340-47. https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32832d93dd.

Beck, Maximilian H., Jens K. Haumesser, Johanna Kühn, Jennifer Altschüler, Andrea A. Kühn, et Christoph Van Riesen. 2016. « Short- and Long-Term Dopamine Depletion Causes Enhanced Beta Oscillations in the Cortico-Basal Ganglia Loop of Parkinsonian Rats ». *Experimental Neurology* 286 (décembre):124-36. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.10.005.

Beckwitt, Colin H., Amanda M. Clark, Sarah Wheeler, D. Lansing Taylor, Donna B. Stolz, Linda Griffith, et Alan Wells. 2018. « Liver 'Organ on a Chip' ». *Experimental Cell Research* 363 (1): 15-25. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.12.023.

Bengtsson, Sara L, Zoltán Nagy, Stefan Skare, Lea Forsman, Hans Forssberg, et Fredrik Ullén. 2005. « Extensive Piano Practicing Has Regionally Specific Effects on White Matter Development ». *Nature Neuroscience* 8 (9): 1148-50. https://doi.org/10.1038/nn1516.

Berendse, Henk W., Yvonne Galis-De Graaf, et Henk J. Groenewegen. 1992. « Topographical Organization and Relationship with Ventral Striatal Compartments of Prefrontal Corticostriatal Projections in the Rat ». *Journal of Comparative Neurology* 316 (3): 314-47. https://doi.org/10.1002/cne.903160305.

Bhatia, Sangeeta N, et Donald E Ingber. 2014. « Microfluidic Organs-on-Chips ». *Nature Biotechnology* 32 (8): 760-72. https://doi.org/10.1038/nbt.2989.

Bhattacharjee, Nirveek, et Albert Folch. 2017. « Large-Scale Microfluidic Gradient Arrays Reveal Axon Guidance Behaviors in Hippocampal Neurons ». *Microsystems & Nanoengineering* 3 (1): 17003. https://doi.org/10.1038/micronano.2017.3.

Bijland, Silvia, Gemma Thomson, Matthew Euston, Kyriakos Michail, Katja Thümmler, Steve Mücklisch, Colin L. Crawford, et al. 2019. « An in Vitro Model for Studying CNS White Matter: Functional Properties and Experimental Approaches ». *F1000Research* 8 (janvier):117. https://doi.org/10.12688/f1000research.16802.1.

Binda, Anna, Ilaria Rivolta, Chiara Villa, Elisa Chisci, Massimiliano Beghi, Cesare M. Cornaggia, Roberto Giovannoni, et Romina Combi. 2018. « A Novel KCNJ2 Mutation Identified in an Autistic Proband Affects the Single Channel Properties of Kir2.1 ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12 (mars):76. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00076.

Blumenrath, Sandra H, Bo Y Lee, Lucie Low, Ranjini Prithviraj, et Danilo Tagle. 2020. « Tackling Rare Diseases: Clinical Trials on Chips ». *Experimental Biology and Medicine* 245 (13): 1155-62. https://doi.org/10.1177/1535370220924743.

Bolognin, Silvia, Marie Fossépré, Xiaobing Qing, Javier Jarazo, Janez Ščančar, Edinson Lucumi Moreno, Sarah L. Nickels, et al. 2019. « 3D Cultures of Parkinson's Disease-Specific Dopaminergic Neurons for High Content Phenotyping and Drug Testing ». *Advanced Science* 6 (1): 1800927. https://doi.org/10.1002/advs.201800927.

Bourne, Jennifer N., Michael A. Chirillo, et Kristen M. Harris. 2013. « Presynaptic Ultrastructural Plasticity Along CA3→CA1 Axons During Long-Term Potentiation in Mature Hippocampus ». *Journal of Comparative Neurology* 521 (17): 3898-3912. https://doi.org/10.1002/cne.23384.

Brofiga, Martina, Marietta Pisano, Roberto Raiteri, et Paolo Massobrio. 2021. « On the road to the brain-on-a-chip: a review on strategies, methods, and applications ». *Journal of Neural Engineering* 18 (4): 041005. https://doi.org/10.1088/1741-2552/ac15e4.

Brown, Laurie, Terry Koerner, J. Hugh Horton, et Richard D. Oleschuk. 2006. « Fabrication and Characterization of Poly(Methylmethacrylate) Microfluidic Devices Bonded Using Surface Modifications and Solvents ». *Lab Chip* 6 (1): 66-73. https://doi.org/10.1039/B512179E.

Browne. 2008. « A PDMS PINCH VALVE WITH ZERO DEAD VOLUME AS A VALVING MODULE FOR RIGID POLYMER LAB CHIPS ». https://api.semanticscholar.org/CorpusID:138906775.

Bullmore, Ed, et Olaf Sporns. 2009. « Complex Brain Networks: Graph Theoretical Analysis of Structural and Functional Systems ». *Nature Reviews Neuroscience* 10 (3): 186-98. https://doi.org/10.1038/nrn2575.

———. 2012. « The Economy of Brain Network Organization ». *Nature Reviews Neuroscience* 13 (5): 336-49. https://doi.org/10.1038/nrn3214.

Bullmore, E.T., S. Frangou, et R.M. Murray. 1997. « The Dysplastic Net Hypothesis: An Integration of Developmental and Dysconnectivity Theories of Schizophrenia ». *Schizophrenia Research* 28 (2-3): 143-56. https://doi.org/10.1016/S0920-9964(97)00114-X.

Bureau, Geneviève, Mélanie Carrier, Manon Lebel, et Michel Cyr. 2010. « Intrastriatal Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Kinases Impaired the Consolidation Phase of Motor Skill Learning ». *Neurobiology of Learning and Memory* 94 (1): 107-15. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.04.008.

Burrone, Juan, Michael O'Byrne, et Venkatesh N. Murthy. 2002. « Multiple Forms of Synaptic Plasticity Triggered by Selective Suppression of Activity in Individual Neurons ». *Nature* 420 (6914): 414-18. https://doi.org/10.1038/nature01242.

Calafate, Sara, Arjan Buist, Katarzyna Miskiewicz, Vinoy Vijayan, Guy Daneels, Bart de Strooper, Joris de Wit, Patrik Verstreken, et Diederik Moechars. 2015. « Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation ». *Cell Reports* 11 (8): 1176-83. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.043.

Campenot, Robert B. 1982. « Development of Sympathetic Neurons in Compartmentalized Cultures ». *Developmental Biology* 93 (1): 1-12. https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90232-9.

Casals-Terré, J., M. Duch, J.A. Plaza, J. Esteve, R. Pérez-Castillejos, E. Vallés, et E. Gómez. 2008. « Design, Fabrication and Characterization of an Externally Actuated ON/OFF Microvalve ». *Sensors and Actuators A: Physical* 147 (2): 600-606. https://doi.org/10.1016/j.sna.2008.06.022.

Casanova, Manuel F., Imke A. J. Van Kooten, Andrew E. Switala, Herman Van Engeland, Helmut Heinsen, Harry W. M. Steinbusch, Patrick R. Hof, Juan Trippe, Janet Stone, et Christoph Schmitz. 2006. « Minicolumnar Abnormalities in Autism ». *Acta Neuropathologica* 112 (3): 287-303. https://doi.org/10.1007/s00401-006-0085-5.

Cerutti, Letizia, et Martina Brofiga. 2024. « Unraveling Brain Diseases: The Promise of Brain-on-a-Chip Models ». *Journal of Neuroscience Methods* 405 (mai):110105. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2024.110105.

Chambers, Stuart M, Christopher A Fasano, Eirini P Papapetrou, Mark Tomishima, Michel Sadelain, et Lorenz Studer. 2009. « Highly Efficient Neural Conversion of Human ES and iPS Cells by Dual Inhibition of SMAD Signaling ». *Nature Biotechnology* 27 (3): 275-80. https://doi.org/10.1038/nbt.1529.

Chen, Sisi, et Luke P. Lee. 2010. « Non-Invasive Microfluidic Gap Junction Assay ». *Integrative Biology* 2 (2-3): 130. https://doi.org/10.1039/b919392h.

Chéreau, Ronan, G. Ezequiel Saraceno, Julie Angibaud, Daniel Cattaert, et U. Valentin Nägerl. 2017. « Superresolution Imaging Reveals Activity-Dependent Plasticity of Axon Morphology Linked to Changes in Action Potential Conduction Velocity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (6): 1401-6. https://doi.org/10.1073/pnas.1607541114.

Cho, Ann-Na, Yoonhee Jin, Yeonjoo An, Jin Kim, Yi Sun Choi, Jung Seung Lee, Junghoon Kim, et al. 2021. « Microfluidic Device with Brain Extracellular Matrix Promotes Structural and Functional Maturation of Human Brain Organoids ». *Nature Communications* 12 (1): 4730. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24775-5.

Choi, Yoon Jung, Sukyung Chae, Jeong Hun Kim, Kate F. Barald, Joong Yull Park, et Sang-Hoon Lee. 2013. « Neurotoxic Amyloid Beta Oligomeric Assemblies Recreated in Microfluidic Platform with Interstitial Level of Slow Flow ». *Scientific Reports* 3 (1): 1921. https://doi.org/10.1038/srep01921.

Coquinco, Ainsley, Luba Kojic, Wendy Wen, Yu Tian Wang, Noo Li Jeon, Austen J. Milnerwood, et Max Cynader. 2014. « A Microfluidic Based *in Vitro* Model of Synaptic Competition ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 60 (mai):43-52. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.03.001.

Courchesne, Eric. 1997. « Brainstem, Cerebellar and Limbic Neuroanatomical Abnormalities in Autism ». *Current Opinion in Neurobiology* 7 (2): 269-78. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80016-5.

Craig, A M, et G Banker. 1994. « Neuronal Polarity ». *Annual Review of Neuroscience* 17 (1): 267-310. https://doi.org/10.1146/annurev.ne.17.030194.001411.

Criscione, Joseph, Zahra Rezaei, Carol M. Hernandez Cantu, Sean Murphy, Su Ryon Shin, et Deok-Ho Kim. 2023. « Heart-on-a-Chip Platforms and Biosensor Integration for Disease Modeling and Phenotypic Drug Screening ». *Biosensors and Bioelectronics* 220 (janvier):114840. https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114840.

Crossley, Nicolas A., Andrea Mechelli, Jessica Scott, Francesco Carletti, Peter T. Fox, Philip McGuire, et Edward T. Bullmore. 2014. « The Hubs of the Human Connectome Are Generally Implicated in the Anatomy of Brain Disorders ». *Brain* 137 (8): 2382-95. https://doi.org/10.1093/brain/awu132.

Debray, A., K. Ueda, M. Shibata, et H. Fujita. 2007. « Fabrication of Suspended Metallic Structures: Application to a One-Shot Micro-Valve ». *IEICE Electronics Express* 4 (14): 455-60. https://doi.org/10.1587/elex.4.455.

Deleglise, Bérangére, Sebastien Magnifico, Eric Duplus, Pauline Vaur, Vanessa Soubeyre, Morgane Belle, Maeva Vignes, et al. 2014. « β-Amyloid Induces a Dying-Back Process and Remote Trans-Synaptic Alterations in a Microfluidic-Based Reconstructed Neuronal Network ». *Acta Neuropathologica Communications* 2 (1): 145. https://doi.org/10.1186/s40478-014-0145-3.

Delling, Jan Philipp, et Tobias M. Boeckers. 2021. « Comparison of SHANK3 Deficiency in Animal Models: Phenotypes, Treatment Strategies, and Translational Implications ». *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 13 (1): 55. https://doi.org/10.1186/s11689-021-09397-8.

Devan, Bryan D., et Norman M. White. 1999. « Parallel Information Processing in the Dorsal Striatum: Relation to Hippocampal Function ». *The Journal of Neuroscience* 19 (7): 2789-98. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-07-02789.1999.

Dewey, C. F., S. R. Bussolari, M. A. Gimbrone, et P. F. Davies. 1981. « The Dynamic Response of Vascular Endothelial Cells to Fluid Shear Stress ». *Journal of Biomechanical Engineering* 103 (3): 177-85. https://doi.org/10.1115/1.3138276.

Di Martino, Adriana, Clare Kelly, Rebecca Grzadzinski, Xi-Nian Zuo, Maarten Mennes, Maria Angeles Mairena, Catherine Lord, F. Xavier Castellanos, et Michael P. Milham. 2011. « Aberrant Striatal Functional Connectivity in Children with Autism ». *Biological Psychiatry* 69 (9): 847-56. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.10.029.

Ding, Jianfu, Jia Jiang, Chantal Blanchetière, et Claire L. Callender. 2008. « Highly Fluorinated Aromatic−Aliphatic Copolyethers ». *Macromolecules* 41 (3): 758-63. https://doi.org/10.1021/ma071766n.

Domansky, Karel, Walker Inman, James Serdy, Ajit Dash, Matthew H. M. Lim, et Linda G. Griffith. 2010. « Perfused Multiwell Plate for 3D Liver Tissue Engineering ». *Lab Chip* 10 (1): 51-58. https://doi.org/10.1039/B913221J.

Doudna, Jennifer A., et Emmanuelle Charpentier. 2014. « The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9 ». *Science* 346 (6213): 1258096. https://doi.org/10.1126/science.1258096.

Douville, Nicholas J., Yi-Chung Tung, Ran Li, Jack D. Wang, Mohamed E.H. El-Sayed, et Shuichi Takayama. 2010. « Fabrication of Two-Layered Channel System with Embedded Electrodes to Measure Resistance Across Epithelial and Endothelial Barriers ». *Analytical Chemistry* 82 (6): 2505-11. https://doi.org/10.1021/ac9029345.

Doyon, Julien, et Habib Benali. 2005. « Reorganization and Plasticity in the Adult Brain during Learning of Motor Skills ». *Current Opinion in Neurobiology* 15 (2): 161-67. https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.03.004.

Draganski, Bogdan, Christian Gaser, Volker Busch, Gerhard Schuierer, Ulrich Bogdahn, et Arne May. 2004. « Changes in Grey Matter Induced by Training ». *Nature* 427 (6972): 311-12. https://doi.org/10.1038/427311a.

Driver, Rishab, et Shweta Mishra. 2023. « Organ-On-A-Chip Technology: An In-Depth Review of Recent Advancements and Future of Whole Body-on-Chip ». *BioChip Journal* 17 (1): 1-23. https://doi.org/10.1007/s13206-022-00087-8.

Duffy, David C., J. Cooper McDonald, Olivier J. A. Schueller, et George M. Whitesides. 1998. « Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(Dimethylsiloxane) ». *Analytical Chemistry* 70 (23): 4974-84. https://doi.org/10.1021/ac980656z.

Emmanouilidou, Evangelia, Georgia Minakaki, Maria V. Keramioti, Mary Xylaki, Evangelos Balafas, Margarita Chrysanthou-Piterou, Ismini Kloukina, et Kostas Vekrellis. 2016. « GABA Transmission via ATP-Dependent $K^+$ Channels Regulates α-Synuclein Secretion in Mouse Striatum ». *Brain* 139 (3): 871-90. https://doi.org/10.1093/brain/awv403.

Ersche, Karen D., Chun Meng, Hisham Ziauddeen, Jan Stochl, Guy B. Williams, Edward T. Bullmore, et Trevor W. Robbins. 2020. « Brain Networks Underlying Vulnerability and Resilience to Drug Addiction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (26): 15253-61. https://doi.org/10.1073/pnas.2002509117.

Esch, Eric W., Anthony Bahinski, et Dongeun Huh. 2015. « Organs-on-Chips at the Frontiers of Drug Discovery ». *Nature Reviews Drug Discovery* 14 (4): 248-60. https://doi.org/10.1038/nrd4539.

Ewart, Lorna, Athanasia Apostolou, Skyler A. Briggs, Christopher V. Carman, Jake T. Chaff, Anthony R. Heng, Sushma Jadalannagari, et al. 2022. « Performance Assessment and Economic Analysis of a Human Liver-Chip for Predictive Toxicology ». *Communications Medicine* 2 (1): 154. https://doi.org/10.1038/s43856-022-00209-1.

Ewart, Lorna, et Adrian Roth. 2021. « Opportunities and Challenges with Microphysiological Systems: A Pharma End-User Perspective ». *Nature Reviews Drug Discovery* 20 (5): 327-28. https://doi.org/10.1038/d41573-020-00030-2.

Fanizza, Francesca, Marzia Campanile, Gianluigi Forloni, Carmen Giordano, et Diego Albani. 2022. « Induced Pluripotent Stem Cell-Based Organ-on-a-Chip as Personalized Drug Screening Tools: A Focus on Neurodegenerative Disorders ». *Journal of Tissue Engineering* 13 (janvier):204173142210953. https://doi.org/10.1177/20417314221095339.

Fantuzzo, Joseph A., Lidia De Filippis, Heather McGowan, Nan Yang, Yi-Han Ng, Apoorva Halikere, Jing-Jing Liu, et al. 2017. « µNeurocircuitry: Establishing *in Vitro* Models of Neurocircuits with Human Neurons ». *TECHNOLOGY* 05 (02): 87-97. https://doi.org/10.1142/S2339547817500054.

Farhang Doost, Negar, et Soumya K. Srivastava. 2024. « A Comprehensive Review of Organ-on-a-Chip Technology and Its Applications ». *Biosensors* 14 (5): 225. https://doi.org/10.3390/bios14050225.

Fernandes, João T. S., Oldriska Chutna, Virginia Chu, João P. Conde, et Tiago F. Outeiro. 2016. « A Novel Microfluidic Cell Co-Culture Platform for the Study of the Molecular Mechanisms of Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies ». *Frontiers in Neuroscience* 10 (novembre). https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00511.

Fernandes, João Tiago S., Sandra Tenreiro, Andreia Gameiro, Virginia Chu, Tiago F. Outeiro, et João P. Conde. 2014. « Modulation of Alpha-Synuclein Toxicity in Yeast Using a Novel Microfluidic-Based Gradient Generator ». *Lab Chip* 14 (20): 3949-57. https://doi.org/10.1039/C4LC00756E.

Flaherty, A. W., et A. M. Graybiel. 1991. « Corticostriatal Transformations in the Primate Somatosensory System. Projections from Physiologically Mapped Body-Part Representations ». *Journal of Neurophysiology* 66 (4): 1249-63. https://doi.org/10.1152/jn.1991.66.4.1249.

Fornito, Alex, et Edward T Bullmore. 2010. « What Can Spontaneous Fluctuations of the Blood Oxygenation-Level-Dependent Signal Tell Us about Psychiatric Disorders? » *Current Opinion in Psychiatry* 23 (3): 239-49. https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e328337d78d.

Forro, Csaba, Davide Caron, Gian Angotzi, Vincenzo Gallo, Luca Berdondini, Francesca Santoro, Gemma Palazzolo, et Gabriella Panuccio. 2021. « Electrophysiology Read-Out Tools for Brain-on-Chip Biotechnology ». *Micromachines* 12 (2): 124. https://doi.org/10.3390/mi12020124.

Forró, Csaba, Greta Thompson-Steckel, Sean Weaver, Serge Weydert, Stephan Ihle, Harald Dermutz, Mathias J. Aebersold, Raphael Pilz, László Demkó, et János Vörös. 2018. « Modular Microstructure Design to Build Neuronal Networks of Defined Functional Connectivity ». *Biosensors and Bioelectronics* 122 (décembre):75-87. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.075.

Frey, Olivier, Patrick M. Misun, David A. Fluri, Jan G. Hengstler, et Andreas Hierlemann. 2014. « Reconfigurable Microfluidic Hanging Drop Network for Multi-Tissue Interaction and Analysis ». *Nature Communications* 5 (1): 4250. https://doi.org/10.1038/ncomms5250.

Fuccillo, Marc V. 2016. « Striatal Circuits as a Common Node for Autism Pathophysiology ». *Frontiers in Neuroscience* 10 (février). https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00027.

Gaj, Thomas, David S. Ojala, Freja K. Ekman, Leah C. Byrne, Prajit Limsirichai, et David V. Schaffer. 2017. « In Vivo Genome Editing Improves Motor Function and Extends Survival in a Mouse Model of ALS ». *Science Advances* 3 (12): eaar3952. https://doi.org/10.1126/sciadv.aar3952.

Ganguly, Archan, et Daewoo Lee. 2013. « Suppression of Inhibitory GABA Ergic Transmission by cAMP Signaling Pathway: Alterations in Learning and Memory Mutants ». *European Journal of Neuroscience* 37 (9): 1383-93. https://doi.org/10.1111/ejn.12144.

Gholizadeh, Azam, et Mehdi Javanmard. 2016. « Magnetically Actuated Microfluidic Transistors: Miniaturized Micro-Valves Using Magnetorheological Fluids Integrated With Elastomeric Membranes ». *Journal of Microelectromechanical Systems* 25 (5): 922-28. https://doi.org/10.1109/JMEMS.2016.2586420.

Gladkov, Arseniy, Yana Pigareva, Daria Kutyina, Vladimir Kolpakov, Anton Bukatin, Irina Mukhina, Victor Kazantsev, et Alexey Pimashkin. 2017. « Design of Cultured Neuron Networks in Vitro with Predefined Connectivity Using Asymmetric Microfluidic Channels ». *Scientific Reports* 7 (1): 15625. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15506-2.

Glasser, Matthew F., Timothy S. Coalson, Emma C. Robinson, Carl D. Hacker, John Harwell, Essa Yacoub, Kamil Ugurbil, et al. 2016. « A Multi-Modal Parcellation of Human Cerebral Cortex ». *Nature* 536 (7615): 171-78. https://doi.org/10.1038/nature18933.

Graybiel, Ann M. 1995. « Building Action Repertoires: Memory and Learning Functions of the Basal Ganglia ». *Current Opinion in Neurobiology* 5 (6): 733-41. https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80100-6.

Graybiel, Ann M. 2008. « Habits, Rituals, and the Evaluative Brain ». *Annual Review of Neuroscience* 31 (1): 359-87. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112851.

Gremel, Christina M., et Rui M. Costa. 2013. « Orbitofrontal and Striatal Circuits Dynamically Encode the Shift between Goal-Directed and Habitual Actions ». *Nature Communications* 4 (1): 2264. https://doi.org/10.1038/ncomms3264.

Grienberger, Christine, et Arthur Konnerth. 2012. « Imaging Calcium in Neurons ». *Neuron* 73 (5): 862-85. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011.

Gumuscu, Burcu, Hugo J. Albers, Albert Van Den Berg, Jan C. T. Eijkel, et Andries D. Van Der Meer. 2017. « Compartmentalized 3D Tissue Culture Arrays under Controlled Microfluidic Delivery ». *Scientific Reports* 7 (1): 3381. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01944-5.

Haber, Suzanne N. 2003. « The Primate Basal Ganglia: Parallel and Integrative Networks ». *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26 (4): 317-30. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2003.10.003.

———. 2016. « Corticostriatal Circuitry ». *Dialogues in Clinical Neuroscience* 18 (1): 7-21. https://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.1/shaber.

Han, Sukmin, Seokyoung Bang, Hong Nam Kim, Nakwon Choi, et Sung Hyun Kim. 2023. « Modulating and Monitoring the Functionality of Corticostriatal Circuits Using an Electrostimulable Microfluidic Device ». *Molecular Brain* 16 (1): 13. https://doi.org/10.1186/s13041-023-01007-z.

Hinckelmann, María-Victoria, Amandine Virlogeux, Christian Niehage, Christel Poujol, Daniel Choquet, Bernard Hoflack, Diana Zala, et Frédéric Saudou. 2016. « Self-Propelling Vesicles Define Glycolysis as the Minimal Energy Machinery for Neuronal Transport ». *Nature Communications* 7 (1): 13233. https://doi.org/10.1038/ncomms13233.

Hintiryan, Houri, Nicholas N Foster, Ian Bowman, Maxwell Bay, Monica Y Song, Lin Gou, Seita Yamashita, et al. 2016. « The Mouse Cortico-Striatal Projectome ». *Nature Neuroscience* 19 (8): 1100-1114. https://doi.org/10.1038/nn.4332.

Holtzman, D. M., J. Herz, et G. Bu. 2012. « Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (3): a006312-a006312. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006312.

Honegger, Thibault, Mark A. Scott, Mehmet F. Yanik, et Joel Voldman. 2013a. « Electrokinetic Confinement of Axonal Growth for Dynamically Configurable Neural Networks ». *Lab on a Chip* 13 (4): 589. https://doi.org/10.1039/c2lc41000a.

———. 2013b. « Electrokinetic Confinement of Axonal Growth for Dynamically Configurable Neural Networks ». *Lab on a Chip* 13 (4): 589. https://doi.org/10.1039/c2lc41000a.

Hübener, Mark, et Tobias Bonhoeffer. 2010. « Searching for Engrams ». *Neuron* 67 (3): 363-71. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.033.

Huh, Dongeun (Dan). 2015. « A Human Breathing Lung-on-a-Chip ». *Annals of the American Thoracic Society* 12 (Supplement 1): S42-44. https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201410-442MG.

Huh, Dongeun, Daniel C. Leslie, Benjamin D. Matthews, Jacob P. Fraser, Samuel Jurek, Geraldine A. Hamilton, Kevin S. Thorneloe, Michael Allen McAlexander, et Donald E. Ingber. 2012. « A Human Disease Model of Drug Toxicity–Induced Pulmonary Edema in

a Lung-on-a-Chip Microdevice ». *Science Translational Medicine* 4 (159). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004249.

Huh, Dongeun, Benjamin D. Matthews, Akiko Mammoto, Martín Montoya-Zavala, Hong Yuan Hsin, et Donald E. Ingber. 2010. « Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip ». *Science* 328 (5986): 1662-68. https://doi.org/10.1126/science.1188302.

Hyman, Steven E. 2012. « Revolution Stalled ». *Science Translational Medicine* 4 (155). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003142.

Imbrici, Paola, Diana Conte Camerino, et Domenico Tricarico. 2013. « Major Channels Involved in Neuropsychiatric Disorders and Therapeutic Perspectives ». *Frontiers in Genetics* 4. https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00076.

Ito, Y., I. Kawauchi, Y. Yanagita, Y. Sakai, M. Nishikawa, H. Arakawa, M. Kadoguchi, et al. 2024. « Microphysiological Systems for Realizing Microenvironment That Mimics Human Physiology—Functional Material and Its Standardization Applied to Microfluidics ». *Emergent Materials*, août. https://doi.org/10.1007/s42247-024-00822-x.

Iturria-Medina, Y., E.J. Canales-Rodríguez, L. Melie-García, P.A. Valdés-Hernández, E. Martínez-Montes, Y. Alemán-Gómez, et J.M. Sánchez-Bornot. 2007. « Characterizing Brain Anatomical Connections Using Diffusion Weighted MRI and Graph Theory ». *NeuroImage* 36 (3): 645-60. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.02.012.

Jensen, Erik C., Bharath P. Bhat, et Richard A. Mathies. 2010. « A Digital Microfluidic Platform for the Automation of Quantitative Biomolecular Assays ». *Lab Chip* 10 (6): 685-91. https://doi.org/10.1039/B920124F.

Jeong, Sehoon, Sunja Kim, John Buonocore, Jaewon Park, C. Jane Welsh, Jianrong Li, et Arum Han. 2018. « A Three-Dimensional Arrayed Microfluidic Blood–Brain Barrier Model With Integrated Electrical Sensor Array ». *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 65 (2): 431-39. https://doi.org/10.1109/TBME.2017.2773463.

Kalil, Katherine, et Erik W Dent. 2005. « Touch and Go: Guidance Cues Signal to the Growth Cone Cytoskeleton ». *Current Opinion in Neurobiology* 15 (5): 521-26. https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.08.005.

Karmur, Brij S., Justine Philteos, Aram Abbasian, Brad E. Zacharia, Nir Lipsman, Victor Levin, Stuart Grossman, et Alireza Mansouri. 2020. « Blood-Brain Barrier Disruption in Neuro-Oncology: Strategies, Failures, and Challenges to Overcome ». *Frontiers in Oncology* 10 (septembre):563840. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.563840.

Kasturi, Satish, Sri Ramulu Torati, Yunji Eom, et CheolGi Kim. 2021. « Microvalve-Controlled Miniaturized Electrochemical Lab-on-a-Chip Based Biosensor for the Detection of β-Amyloid Biomarker ». *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 97 (mai):349-55. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.02.020.

Katz, L. C., et C. J. Shatz. 1996. « Synaptic Activity and the Construction of Cortical Circuits ». *Science* 274 (5290): 1133-38. https://doi.org/10.1126/science.274.5290.1133.

Kelley, A.E., V.B. Domesick, et W.J.H. Nauta. 1982. « The Amygdalostriatal Projection in the Rat—an Anatomical Study by Anterograde and Retrograde Tracing Methods ». *Neuroscience* 7 (3): 615-30. https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90067-7.

Keuper-Navis, Marit, Markus Walles, Birk Poller, Adam Myszczyszyn, Thomas K. Van Der Made, Joanne Donkers, Hossein Eslami Amirabadi, et al. 2023. « The Application of Organ-on-Chip Models for the Prediction of Human Pharmacokinetic Profiles during Drug Development ». *Pharmacological Research* 195 (septembre):106853. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106853.

Kida, Satoshi, Sheena A. Josselyn, Sandra Peña De Ortiz, Jeffrey H. Kogan, Itzamarie Chevere, Shoichi Masushige, et Alcino J. Silva. 2002. « CREB Required for the Stability of New and Reactivated Fear Memories ». *Nature Neuroscience* 5 (4): 348-55. https://doi.org/10.1038/nn819.

Kilinc, Devrim, Agata Blasiak, et Gil U. Lee. 2015. « Microtechnologies for Studying the Role of Mechanics in Axon Growth and Guidance ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (juillet). https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00282.

Kim, Hyun Jung, Dongeun Huh, Geraldine Hamilton, et Donald E. Ingber. 2012. « Human Gut-on-a-Chip Inhabited by Microbial Flora That Experiences Intestinal Peristalsis-like Motions and Flow ». *Lab on a Chip* 12 (12): 2165. https://doi.org/10.1039/c2lc40074j.

Kim, Soo-hyun, et Mi-Yoon Chang. 2023. « Application of Human Brain Organoids—Opportunities and Challenges in Modeling Human Brain Development and Neurodevelopmental Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (15): 12528. https://doi.org/10.3390/ijms241512528.

Knight, Andrew. 2011. « The Costs and Benefits of Animal Experiments: Andrew Knight, 2011, Palgrave Macmillan (New York, 978-0-230-24392-7, 272 Pp.) ». *Journal of Bioethical Inquiry* 10 (4): 515-17. https://doi.org/10.1007/s11673-013-9484-1.

Kola, Ismail, et John Landis. 2004. « Can the Pharmaceutical Industry Reduce Attrition Rates? » *Nature Reviews Drug Discovery* 3 (8): 711-16. https://doi.org/10.1038/nrd1470.

Kole, Maarten H P, Susanne U Ilschner, Björn M Kampa, Stephen R Williams, Peter C Ruben, et Greg J Stuart. 2008. « Action Potential Generation Requires a High Sodium Channel Density in the Axon Initial Segment ». *Nature Neuroscience* 11 (2): 178-86. https://doi.org/10.1038/nn2040.

Kostovic, I. 2002. « Laminar Organization of the Human Fetal Cerebrum Revealed by Histochemical Markers and Magnetic Resonance Imaging ». *Cerebral Cortex* 12 (5): 536-44. https://doi.org/10.1093/cercor/12.5.536.

Kostrzewski, Tomasz, Sophie Snow, Anya Lindström Battle, Samantha Peel, Zahida Ahmad, Jayati Basak, Manasa Surakala, et al. 2021. « Modelling Human Liver Fibrosis in the Context of Non-Alcoholic Steatohepatitis Using a Microphysiological System ». *Communications Biology* 4 (1): 1080. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02616-x.

Krol, Alexandra, et Guoping Feng. 2018. « Windows of Opportunity: Timing in Neurodevelopmental Disorders ». *Current Opinion in Neurobiology* 48 (février):59-63. https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.014.

Kunze, Anja, Sylvain Lengacher, Elisabeth Dirren, Patrick Aebischer, Pierre J. Magistretti, et Philippe Renaud. 2013. « Astrocyte–Neuron Co-Culture on Microchips Based on the Model of SOD Mutation to Mimic ALS ». *Integrative Biology* 5 (7): 964-75. https://doi.org/10.1039/c3ib40022k.

Lancaster, Madeline A., Magdalena Renner, Carol-Anne Martin, Daniel Wenzel, Louise S. Bicknell, Matthew E. Hurles, Tessa Homfray, Josef M. Penninger, Andrew P. Jackson, et Juergen A. Knoblich. 2013. « Cerebral Organoids Model Human Brain Development and Microcephaly ». *Nature* 501 (7467): 373-79. https://doi.org/10.1038/nature12517.

Lassus, Benjamin, Jérémie Naudé, Philippe Faure, Denis Guedin, Ysander Von Boxberg, Clotilde Mannoury La Cour, Mark J. Millan, et Jean-Michel Peyrin. 2018. « Glutamatergic and Dopaminergic Modulation of Cortico-Striatal Circuits Probed by Dynamic Calcium Imaging of Networks Reconstructed in Microfluidic Chips ». *Scientific Reports* 8 (1): 17461. https://doi.org/10.1038/s41598-018-35802-9.

Lau, Alan, Hon Yip, Kathy Ng, Xin Cui, et Raymond Lam. 2014. « Dynamics of Microvalve Operations in Integrated Microfluidics ». *Micromachines* 5 (1): 50-65. https://doi.org/10.3390/mi5010050.

Lecault, Véronique, Michael VanInsberghe, Sanja Sekulovic, David J H F Knapp, Stefan Wohrer, William Bowden, Francis Viel, et al. 2011. « High-Throughput Analysis of Single Hematopoietic Stem Cell Proliferation in Microfluidic Cell Culture Arrays ». *Nature Methods* 8 (7): 581-86. https://doi.org/10.1038/nmeth.1614.

Lee, Chun-Ting, Raphael M. Bendriem, Wells W. Wu, et Rong-Fong Shen. 2017. « 3D Brain Organoids Derived from Pluripotent Stem Cells: Promising Experimental Models for Brain Development and Neurodegenerative Disorders ». *Journal of Biomedical Science* 24 (1): 59. https://doi.org/10.1186/s12929-017-0362-8.

Lee, Jessamine Ng, Cheolmin Park, et George M. Whitesides. 2003. « Solvent Compatibility of Poly(Dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices ». *Analytical Chemistry* 75 (23): 6544-54. https://doi.org/10.1021/ac0346712.

Lefebvre, Camille, Anaïs-Camille Vreulx, Corentin Dumortier, Séverine Bégard, Carla Gelle, Dolores Siedlecki-Wullich, Morvane Colin, Devrim Kilinc, et Sophie Halliez. 2024. « Integration of Microfluidic Devices with Microelectrode Arrays to Functionally Assay Amyloid-β-Induced Synaptotoxicity ». *ACS Biomaterials Science & Engineering* 10 (3): 1856-68. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c00997.

Lenk, Kerstin, Barbara Priwitzer, Laura Ylä-Outinen, Lukas H. B. Tietz, Susanna Narkilahti, et Jari A. K. Hyttinen. 2016. « Simulation of Developing Human Neuronal Cell Networks ». *BioMedical Engineering OnLine* 15 (1): 105. https://doi.org/10.1186/s12938-016-0226-6.

Leung, Chak Ming, Pim De Haan, Kacey Ronaldson-Bouchard, Ge-Ah Kim, Jihoon Ko, Hoon Suk Rho, Zhu Chen, et al. 2022. « A Guide to the Organ-on-a-Chip ». *Nature Reviews Methods Primers* 2 (1): 33. https://doi.org/10.1038/s43586-022-00118-6.

Li, Wei, et Lucas Pozzo-Miller. 2020. « Dysfunction of the Corticostriatal Pathway in Autism Spectrum Disorders ». *Journal of Neuroscience Research* 98 (11): 2130-47. https://doi.org/10.1002/jnr.24560.

Liga, Antonio, Jonathan A. S. Morton, et Maïwenn Kersaudy-Kerhoas. 2016. « Safe and Cost-Effective Rapid-Prototyping of Multilayer PMMA Microfluidic Devices ». *Microfluidics and Nanofluidics* 20 (12): 164. https://doi.org/10.1007/s10404-016-1823-1.

Liu, Man-Chi, Hsiu-Chen Shih, Jin-Gen Wu, Te-Wei Weng, Chueh-Yu Wu, Jau-Chin Lu, et Yi-Chung Tung. 2013. « Electrofluidic Pressure Sensor Embedded Microfluidic Device: A Study of Endothelial Cells under Hydrostatic Pressure and Shear Stress Combinations ». *Lab on a Chip* 13 (9): 1743. https://doi.org/10.1039/c3lc41414k.

Ma, Chao, Yansong Peng, Hongtong Li, et Weiqiang Chen. 2021. « Organ-on-a-Chip: A New Paradigm for Drug Development ». *Trends in Pharmacological Sciences* 42 (2): 119-33. https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.11.009.

Machado, Carolina Barcellos, Perrine Pluchon, Peter Harley, Mark Rigby, Victoria Gonzalez Sabater, Danielle C. Stevenson, Stephanie Hynes, et al. 2019. « In Vitro Modeling of Nerve–Muscle Connectivity in a Compartmentalized Tissue Culture Device ». *Advanced Biosystems* 3 (7): 1800307. https://doi.org/10.1002/adbi.201800307.

Mailly, Philippe, Verena Aliane, Henk J. Groenewegen, Suzanne N. Haber, et Jean-Michel Deniau. 2013. « The Rat Prefrontostriatal System Analyzed in 3D: Evidence for Multiple Interacting Functional Units ». *The Journal of Neuroscience* 33 (13): 5718-27. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5248-12.2013.

Maisonneuve, B. G. C., L. Libralesso, L. Miny, A. Batut, J. Rontard, M. Gleyzes, B. Boudra, et al. 2022. « Deposition Chamber Technology as Building Blocks for a Standardized Brain-on-Chip Framework ». *Microsystems & Nanoengineering* 8 (1): 86. https://doi.org/10.1038/s41378-022-00406-x.

Malenka, Robert C., et Roger A. Nicoll. 1993. « NMDA-Receptor-Dependent Synaptic Plasticity: Multiple Forms and Mechanisms ». *Trends in Neurosciences* 16 (12): 521-27. https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90197-T.

Maoz, Ben M. 2021. « Brain-on-a-Chip: Characterizing the next Generation of Advanced *in Vitro* Platforms for Modeling the Central Nervous System ». *APL Bioengineering* 5 (3): 030902. https://doi.org/10.1063/5.0055812.

Mariani, Jessica, Maria Vittoria Simonini, Dean Palejev, Livia Tomasini, Gianfilippo Coppola, Anna M. Szekely, Tamas L. Horvath, et Flora M. Vaccarino. 2012. « Modeling Human Cortical Development in Vitro Using Induced Pluripotent Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (31): 12770-75. https://doi.org/10.1073/pnas.1202944109.

Marik, Sally A., Homare Yamahachi, Justin N. J. McManus, Gabor Szabo, et Charles D. Gilbert. 2010. « Axonal Dynamics of Excitatory and Inhibitory Neurons in Somatosensory Cortex ». Édité par Daniel Feldman. *PLoS Biology* 8 (6): e1000395. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000395.

Mastrangeli, M., S. Millet, The Orchid Partners, et J. Van Den Eijnden-van Raaij. 2019. « Organ-on-Chip In Development:Towards a Roadmap for Organs-on-Chip ». https://doi.org/10.20944/preprints201903.0031.v1.

Materne, Eva-Maria, Anja Patricia Ramme, Ana Paula Terrasso, Margarida Serra, Paula Marques Alves, Catarina Brito, Dmitry A. Sakharov, Alexander G. Tonevitsky, Roland Lauster, et Uwe Marx. 2015. « A Multi-Organ Chip Co-Culture of Neurospheres and Liver Equivalents for Long-Term Substance Testing ». *Journal of Biotechnology* 205 (juillet):36-46. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.002.

McConnell, Sk, A Ghosh, et Cj Shatz. 1994. « Subplate Pioneers and the Formation of Descending Connections from Cerebral Cortex ». *The Journal of Neuroscience* 14 (4): 1892-1907. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-04-01892.1994.

McConnell, Susan K., Anirvan Ghosh, et Carla J. Shatz. 1989. « Subplate Neurons Pioneer the First Axon Pathway from the Cerebral Cortex ». *Science* 245 (4921): 978-82. https://doi.org/10.1126/science.2475909.

McDonald, J. Cooper, David C. Duffy, Janelle R. Anderson, Daniel T. Chiu, Hongkai Wu, Olivier J. A. Schueller, et George M. Whitesides. 2000. « Fabrication of Microfluidic Systems in Poly(Dimethylsiloxane) ». *Electrophoresis* 21 (1): 27-40. https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-C.

Mestas, Javier, et Christopher C. W. Hughes. 2004. « Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology ». *The Journal of Immunology* 172 (5): 2731-38. https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731.

Middleton, C. A., et J. A. Sharp. 1984. « The Cultivation of Cells in Vitro ». In *Cell Locomotion in Vitro*, par C. A. Middleton et J. A. Sharp, 8-26. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9772-8_2.

Millet, Larry J., et Martha U. Gillette. 2012. « New Perspectives on Neuronal Development via Microfluidic Environments ». *Trends in Neurosciences* 35 (12): 752-61. https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.09.001.

Moutaux, Eve, Benoit Charlot, Aurélie Genoux, Frédéric Saudou, et Maxime Cazorla. 2018. « An Integrated Microfluidic/Microelectrode Array for the Study of Activity-Dependent Intracellular Dynamics in Neuronal Networks ». *Lab on a Chip* 18 (22): 3425-35. https://doi.org/10.1039/C8LC00694F.

Moutaux, Eve, Wilhelm Christaller, Chiara Scaramuzzino, Aurélie Genoux, Benoit Charlot, Maxime Cazorla, et Frédéric Saudou. 2018. « Neuronal Network Maturation Differently Affects Secretory Vesicles and Mitochondria Transport in Axons ». *Scientific Reports* 8 (1): 13429. https://doi.org/10.1038/s41598-018-31759-x.

Nair, Aarti, Jeffrey M. Treiber, Dinesh K. Shukla, Patricia Shih, et Ralph-Axel Müller. 2013. « Impaired Thalamocortical Connectivity in Autism Spectrum Disorder: A Study of Functional and Anatomical Connectivity ». *Brain* 136 (6): 1942-55. https://doi.org/10.1093/brain/awt079.

Nebuloni, Federico, Quyen B. Do, Peter R. Cook, Edmond J. Walsh, et Richard Wade-Martins. 2024. « A Fluid-Walled Microfluidic Platform for Human Neuron Microcircuits and Directed Axotomy ». *Lab on a Chip* 24 (13): 3252-64. https://doi.org/10.1039/D4LC00107A.

Nelson, Alexandra B., et Anatol C. Kreitzer. 2014. « Reassessing Models of Basal Ganglia Function and Dysfunction ». *Annual Review of Neuroscience* 37 (1): 117-35. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-013916.

Newman, M. E. J. 2003. « The Structure and Function of Complex Networks ». *SIAM Review* 45 (2): 167-256. https://doi.org/10.1137/S003614450342480.

Nieto-Estévez, Vanesa, et Jenny Hsieh. 2020. « Human Brain Organoid Models of Developmental Epilepsies ». *Epilepsy Currents* 20 (5): 282-90. https://doi.org/10.1177/1535759720949254.

Nisenbaum, Es, et Cj Wilson. 1995. « Potassium Currents Responsible for Inward and Outward Rectification in Rat Neostriatal Spiny Projection Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 15 (6): 4449-63. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-06-04449.1995.

Novak, Richard, Miles Ingram, Susan Marquez, Debarun Das, Aaron Delahanty, Anna Herland, Ben M. Maoz, et al. 2020. « Robotic Fluidic Coupling and Interrogation of Multiple Vascularized Organ Chips ». *Nature Biomedical Engineering* 4 (4): 407-20. https://doi.org/10.1038/s41551-019-0497-x.

Oldham, Stuart, et Alex Fornito. 2019. « The Development of Brain Network Hubs ». *Developmental Cognitive Neuroscience* 36 (avril):100607. https://doi.org/10.1016/j.dcn.2018.12.005.

Osaki, Tatsuya, Sebastien G. M. Uzel, et Roger D. Kamm. 2018. « Microphysiological 3D Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) from Human iPS-Derived Muscle Cells and Optogenetic Motor Neurons ». *Science Advances* 4 (10): eaat5847. https://doi.org/10.1126/sciadv.aat5847.

Packard, Mark G., et Barbara J. Knowlton. 2002. « Learning and Memory Functions of the Basal Ganglia ». *Annual Review of Neuroscience* 25 (1): 563-93. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937.

Pan, Liangbin, Sankaraleengam Alagapan, Eric Franca, Stathis S. Leondopulos, Thomas B. DeMarse, Gregory J. Brewer, et Bruce C. Wheeler. 2015. « An in vitro method to manipulate the direction and functional strength between neural populations ». *Frontiers in Neural Circuits* 9 (juillet). https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00032.

Parent, André, et Lili-Naz Hazrati. 1995. « Functional Anatomy of the Basal Ganglia. I. The Cortico-Basal Ganglia-Thalamo-Cortical Loop ». *Brain Research Reviews* 20 (1): 91-127. https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)00007-C.

Park, JiSoo, Bo Kyeong Lee, Gi Seok Jeong, Jung Keun Hyun, C. Justin Lee, et Sang-Hoon Lee. 2015. « Three-Dimensional Brain-on-a-Chip with an Interstitial Level of Flow and Its Application as an in Vitro Model of Alzheimer's Disease ». *Lab on a Chip* 15 (1): 141-50. https://doi.org/10.1039/C4LC00962B.

Park, Joseph, Isaac Wetzel, Ian Marriott, Didier Dréau, Carla D'Avanzo, Doo Yeon Kim, Rudolph E. Tanzi, et Hansang Cho. 2018. « A 3D Human Triculture System Modeling Neurodegeneration and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease ». *Nature Neuroscience* 21 (7): 941-51. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0175-4.

Park, Se Yeon, Hye Jin Hong, et Hyun Jong Lee. 2023. « Fabrication of Cell Spheroids for 3D Cell Culture and Biomedical Applications ». *BioChip Journal* 17 (1): 24-43. https://doi.org/10.1007/s13206-022-00086-9.

Peyrin, Jean-Michel, Bérangère Deleglise, Laure Saias, Maéva Vignes, Paul Gougis, Sebastien Magnifico, Sandrine Betuing, et al. 2011. « Axon Diodes for the Reconstruction of Oriented Neuronal Networks in Microfluidic Chambers ». *Lab on a Chip* 11 (21): 3663. https://doi.org/10.1039/c1lc20014c.

Phan, Duc T. T., Xiaolin Wang, Brianna M. Craver, Agua Sobrino, Da Zhao, Jerry C. Chen, Lilian Y. N. Lee, Steven C. George, Abraham P. Lee, et Christopher C. W. Hughes. 2017. « A Vascularized and Perfused Organ-on-a-Chip Platform for Large-Scale Drug Screening Applications ». *Lab on a Chip* 17 (3): 511-20. https://doi.org/10.1039/C6LC01422D.

Picconi, Barbara, Giovanni Piccoli, et Paolo Calabresi. 2012. « Synaptic Dysfunction in Parkinson's Disease ». In *Synaptic Plasticity*, édité par Michael R. Kreutz et Carlo Sala, 970:553-72. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vienna: Springer Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_24.

Picollet-D'hahan, Nathalie, Agnieszka Zuchowska, Iris Lemeunier, et Séverine Le Gac. 2021. « Multiorgan-on-a-Chip: A Systemic Approach To Model and Decipher Inter-Organ Communication ». *Trends in Biotechnology* 39 (8): 788-810. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.11.014.

Pienkowski, Martin, et Jos J. Eggermont. 2011. « Cortical Tonotopic Map Plasticity and Behavior ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 35 (10): 2117-28. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.002.

Pineda, Florian. s. d. « INTEGRATING HYPER ELASTIC MEMBRANES IN MICROFLUIDIC DEVICES FOR FLUID STORAGE AND AUTONOMOUS DELIVERY ».

Poinsot, Maxime, Marine Dos Santos, Baptiste Marthy, Ana Borges-Correia, Eduardo Gascon-Gonzalo, Benoit Charlot, et Maxime Cazorla. 2024. « Biologically Grounded Brain-on-Chip Model Identifies Selective Topographic Reorganization within Hyperexcitable Neural Networks ». https://doi.org/10.1101/2024.09.30.615880.

Prabhakarpandian, Balabhaskar, Ming-Che Shen, Joseph B. Nichols, Ivy R. Mills, Marta Sidoryk-Wegrzynowicz, Michael Aschner, et Kapil Pant. 2013. « SyM-BBB: A Microfluidic Blood Brain Barrier Model ». *Lab on a Chip* 13 (6): 1093. https://doi.org/10.1039/c2lc41208j.

Preisig-Müller, Regina, Günter Schlichthörl, Tobias Goerge, Steffen Heinen, Andrea Brüggemann, Sindhu Rajan, Christian Derst, Rüdiger W. Veh, et Jürgen Daut. 2002. « Heteromerization of Kir2.x Potassium Channels Contributes to the Phenotype of Andersen's Syndrome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (11): 7774-79. https://doi.org/10.1073/pnas.102609499.

Prentice-Mott, Harrison V., Chi-Han Chang, L. Mahadevan, Timothy J. Mitchison, Daniel Irimia, et Jagesh V. Shah. 2013. « Biased Migration of Confined Neutrophil-like Cells in Asymmetric Hydraulic Environments ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (52): 21006-11. https://doi.org/10.1073/pnas.1317441110.

Probst, Christopher, Stefan Schneider, et Peter Loskill. 2018. « High-Throughput Organ-on-a-Chip Systems: Current Status and Remaining Challenges ». *Current Opinion in Biomedical Engineering* 6 (juin):33-41. https://doi.org/10.1016/j.cobme.2018.02.004.

Puighermanal, Emma, Laia Castell, Jean-Antoine Girault, et Emmanuel Valjent. 2021. « Organisation spatio-moléculaire des neurones D2R du striatum dévoilée par le séquençage d'ARN à haut débit ». *médecine/sciences* 37 (3): 219-21. https://doi.org/10.1051/medsci/2021002.

Qian, Jin-Yuan, Cong-Wei Hou, Xiao-Juan Li, et Zhi-Jiang Jin. 2020. « Actuation Mechanism of Microvalves: A Review ». *Micromachines* 11 (2): 172. https://doi.org/10.3390/mi11020172.

Qian, Jin-yuan, Jia-yi Wu, Zhi-xin Gao, Angjian Wu, et Zhi-jiang Jin. 2019. « Hydrogen Decompression Analysis by Multi-Stage Tesla Valves for Hydrogen Fuel Cell ». *International Journal of Hydrogen Energy* 44 (26): 13666-74. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.235.

Qian, Xuyu, Ha Nam Nguyen, Mingxi M. Song, Christopher Hadiono, Sarah C. Ogden, Christy Hammack, Bing Yao, et al. 2016. « Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-Bioreactors for Modeling ZIKV Exposure ». *Cell* 165 (5): 1238-54. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.032.

Qian, Xuyu, Hongjun Song, et Guo-li Ming. 2019. « Brain Organoids: Advances, Applications and Challenges ». *Development* 146 (8): dev166074. https://doi.org/10.1242/dev.166074.

Ramadan, Qasem, Sajay Bhuvanendran Nair Gourikutty, et Qingxin Zhang. 2020. « OOCHIP: Compartmentalized Microfluidic Perfusion System with Porous Barriers for Enhanced Cell–Cell Crosstalk in Organ-on-a-Chip ». *Micromachines* 11 (6): 565. https://doi.org/10.3390/mi11060565.

Reiner, Anton. 2010. « Corticostriatal projection neurons – dichotomous types and dichotomous functions ». *Frontiers in Neuroanatomy* 4. https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00142.

Renault, Renaud, Jean-Baptiste Durand, Jean-Louis Viovy, et Catherine Villard. 2016. « Asymmetric Axonal Edge Guidance: A New Paradigm for Building Oriented Neuronal Networks ». *Lab on a Chip* 16 (12): 2188-91. https://doi.org/10.1039/C6LC00479B.

Reyes, Darwin R., Henne Van Heeren, Suvajyoti Guha, Luke Herbertson, Alexios P. Tzannis, Jens Ducrée, Hugo Bissig, et Holger Becker. 2021. « Accelerating Innovation and Commercialization through Standardization of Microfluidic-Based Medical Devices ». *Lab on a Chip* 21 (1): 9-21. https://doi.org/10.1039/D0LC00963F.

Robertson, Graham, Trevor J. Bushell, et Michele Zagnoni. 2014. « Chemically Induced Synaptic Activity between Mixed Primary Hippocampal Co-Cultures in a Microfluidic System ». *Integrative Biology* 6 (6): 636-44. https://doi.org/10.1039/c3ib40221e.

Ross, Christopher A, et Sarah J Tabrizi. 2011. « Huntington's Disease: From Molecular Pathogenesis to Clinical Treatment ». *The Lancet Neurology* 10 (1): 83-98. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70245-3.

Royer, Jessica, Boris C. Bernhardt, Sara Larivière, Ezequiel Gleichgerrcht, Bernd J. Vorderwülbecke, Serge Vulliémoz, et Leonardo Bonilha. 2022. « Epilepsy and Brain Network Hubs ». *Epilepsia* 63 (3): 537-50. https://doi.org/10.1111/epi.17171.

Rubinov, Mikail, et Ed. Bullmore. 2013. « Schizophrenia and Abnormal Brain Network Hubs ». *Dialogues in Clinical Neuroscience* 15 (3): 339-49. https://doi.org/10.31887/DCNS.2013.15.3/mrubinov.

Saudou, Frédéric, et Sandrine Humbert. 2016. « The Biology of Huntingtin ». *Neuron* 89 (5): 910-26. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003.

Scannell, Jack W., Alex Blanckley, Helen Boldon, et Brian Warrington. 2012. « Diagnosing the Decline in Pharmaceutical R&D Efficiency ». *Nature Reviews Drug Discovery* 11 (3): 191-200. https://doi.org/10.1038/nrd3681.

Scholz, Jan, Miriam C Klein, Timothy E J Behrens, et Heidi Johansen-Berg. 2009. « Training Induces Changes in White-Matter Architecture ». *Nature Neuroscience* 12 (11): 1370-71. https://doi.org/10.1038/nn.2412.

Schultz, Wolfram. 1997. « Dopamine Neurons and Their Role in Reward Mechanisms ». *Current Opinion in Neurobiology* 7 (2): 191-97. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80007-4.

Schutgens, Frans, Maarten B Rookmaaker, Thanasis Margaritis, Anne Rios, Carola Ammerlaan, Jitske Jansen, Linda Gijzen, et al. 2019. « Tubuloids Derived from Human Adult Kidney and Urine for Personalized Disease Modeling ». *Nature Biotechnology* 37 (3): 303-13. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0048-8.

Scott, Simon, et Zulfiqur Ali. 2021. « Fabrication Methods for Microfluidic Devices: An Overview ». *Micromachines* 12 (3): 319. https://doi.org/10.3390/mi12030319.

Seidi, Azadeh, Hirokazu Kaji, Nasim Annabi, Serge Ostrovidov, Murugan Ramalingam, et Ali Khademhosseini. 2011. « A Microfluidic-Based Neurotoxin Concentration Gradient for the Generation of an *in Vitro* Model of Parkinson's Disease ». *Biomicrofluidics* 5 (2): 022214. https://doi.org/10.1063/1.3580756.

Selemon, Ld, et Ps Goldman-Rakic. 1985. « Longitudinal Topography and Interdigitation of Corticostriatal Projections in the Rhesus Monkey ». *The Journal of Neuroscience* 5 (3): 776-94. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.05-03-00776.1985.

Seyhan, Attila A. 2019. « Lost in Translation: The Valley of Death across Preclinical and Clinical Divide – Identification of Problems and Overcoming Obstacles ». *Translational Medicine Communications* 4 (1): 18. https://doi.org/10.1186/s41231-019-0050-7.

Sheng, Morgan, et Eunjoon Kim. 2000. « The Shank Family of Scaffold Proteins ». *Journal of Cell Science* 113 (11): 1851-56. https://doi.org/10.1242/jcs.113.11.1851.

Shepherd, Gordon M. G. 2013. « Corticostriatal Connectivity and Its Role in Disease ». *Nature Reviews Neuroscience* 14 (4): 278-91. https://doi.org/10.1038/nrn3469.

Shi, Yanhong, Haruhisa Inoue, Joseph C. Wu, et Shinya Yamanaka. 2017. « Induced Pluripotent Stem Cell Technology: A Decade of Progress ». *Nature Reviews Drug Discovery* 16 (2): 115-30. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245.

Shin, Yoojin, Se Hoon Choi, Eunhee Kim, Enjana Bylykbashi, Jeong Ah Kim, Seok Chung, Doo Yeon Kim, Roger D. Kamm, et Rudolph E. Tanzi. 2019. « Blood–Brain Barrier Dysfunction in a 3D In Vitro Model of Alzheimer's Disease ». *Advanced Science* 6 (20): 1900962. https://doi.org/10.1002/advs.201900962.

Shinichi Hirai and Kazuhiro Kato. s. d. « Micro pneumatic valves for wearable robotic systems ». https://api.semanticscholar.org/CorpusID:8219193.

Sicca, Federico, Paola Imbrici, Maria Cristina D'Adamo, Francesca Moro, Fabrizia Bonatti, Paola Brovedani, Alessandro Grottesi, et al. 2011. « Autism with Seizures and Intellectual Disability: Possible Causative Role of Gain-of-Function of the Inwardly-Rectifying K+ Channel Kir4.1 ». *Neurobiology of Disease* 43 (1): 239-47. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.03.016.

Sillé, Fenna, et Thomas Hartung. 2024. « Metabolomics in Preclinical Drug Safety Assessment: Current Status and Future Trends ». *Metabolites* 14 (2): 98. https://doi.org/10.3390/metabo14020098.

Soriano, Jordi. 2023. « Neuronal Cultures: Exploring Biophysics, Complex Systems, and Medicine in a Dish ». *Biophysica* 3 (1): 181-202. https://doi.org/10.3390/biophysica3010012.

Spijkers, Xandor M., Svetlana Pasteuning-Vuhman, Jennifa C. Dorleijn, Paul Vulto, Nienke R. Wevers, et R. Jeroen Pasterkamp. 2021. « A Directional 3D Neurite Outgrowth Model for Studying Motor Axon Biology and Disease ». *Scientific Reports* 11 (1): 2080. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81335-z.

Sporns, O. 2000. « Theoretical Neuroanatomy: Relating Anatomical and Functional Connectivity in Graphs and Cortical Connection Matrices ». *Cerebral Cortex* 10 (2): 127-41. https://doi.org/10.1093/cercor/10.2.127.

Sporns, O, D Chialvo, M Kaiser, et C Hilgetag. 2004. « Organization, Development and Function of Complex Brain Networks ». *Trends in Cognitive Sciences* 8 (9): 418-25. https://doi.org/10.1016/j.tics.2004.07.008.

Sporns, Olaf. 2002. « Network Analysis, Complexity, and Brain Function ». *Complexity* 8 (1): 56-60. https://doi.org/10.1002/cplx.10047.

Steinberg, Elizabeth E, Daniel J Christoffel, Karl Deisseroth, et Robert C Malenka. 2015. « Illuminating Circuitry Relevant to Psychiatric Disorders with Optogenetics ». *Current Opinion in Neurobiology* 30 (février):9-16. https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.08.004.

Stoklund Dittlau, Katarina, Emily N. Krasnow, Laura Fumagalli, Tijs Vandoorne, Pieter Baatsen, Axelle Kerstens, Giorgia Giacomazzi, et al. 2021. « Human Motor Units in Microfluidic Devices Are Impaired by FUS Mutations and Improved by HDAC6 Inhibition ». *Stem Cell Reports* 16 (9): 2213-27. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.03.029.

Supèr, H, E Soriano, et H.B.M Uylings. 1998. « The Functions of the Preplate in Development and Evolution of the Neocortex and Hippocampus ». *Brain Research Reviews* 27 (1): 40-64. https://doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00005-8.

Surmeier, D. James, Jun Ding, Michelle Day, Zhongfeng Wang, et Weixing Shen. 2007. « D1 and D2 Dopamine-Receptor Modulation of Striatal Glutamatergic Signaling in Striatal Medium Spiny Neurons ». *Trends in Neurosciences* 30 (5): 228-35. https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.008.

Sutterby, Emily, Peter Thurgood, Sara Baratchi, Khashayar Khoshmanesh, et Elena Pirogova. 2020. « Microfluidic Skin-on-a-Chip Models: Toward Biomimetic Artificial Skin ». *Small* 16 (39): 2002515. https://doi.org/10.1002/smll.202002515.

Swanson, Larry W. 2011. *Brain Architecture: Understanding the Basic Plan*. Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/med/9780195378580.001.0001.

Tau, Gregory Z, et Bradley S Peterson. 2010. « Normal Development of Brain Circuits ». *Neuropsychopharmacology* 35 (1): 147-68. https://doi.org/10.1038/npp.2009.115.

Taylor, Anne M, Mathew Blurton-Jones, Seog Woo Rhee, David H Cribbs, Carl W Cotman, et Noo Li Jeon. 2005. « A Microfluidic Culture Platform for CNS Axonal Injury,

Regeneration and Transport ». *Nature Methods* 2 (8): 599-605. https://doi.org/10.1038/nmeth777.

Taylor, Anne M., Daniela C. Dieterich, Hiroshi T. Ito, Sally A. Kim, et Erin M. Schuman. 2010. « Microfluidic Local Perfusion Chambers for the Visualization and Manipulation of Synapses ». *Neuron* 66 (1): 57-68. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.022.

Tehranirokh, Masoomeh, Abbas Z. Kouzani, Paul S. Francis, et Jagat R. Kanwar. 2013. « Microfluidic Devices for Cell Cultivation and Proliferation ». *Biomicrofluidics* 7 (5): 051502. https://doi.org/10.1063/1.4826935.

Teixeira, Maria Inês, Maria Helena Amaral, Paulo C. Costa, Carla M. Lopes, et Dimitrios A. Lamprou. 2020. « Recent Developments in Microfluidic Technologies for Central Nervous System Targeted Studies ». *Pharmaceutics* 12 (6): 542. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060542.

Thorsen, Todd, Sebastian J. Maerkl, et Stephen R. Quake. 2002. « Microfluidic Large-Scale Integration ». *Science* 298 (5593): 580-84. https://doi.org/10.1126/science.1076996.

Todd, Tiffany W., et Leonard Petrucelli. 2022. « Modelling Amyotrophic Lateral Sclerosis in Rodents ». *Nature Reviews Neuroscience* 23 (4): 231-51. https://doi.org/10.1038/s41583-022-00564-x.

Toepke, Michael W., et David J. Beebe. 2006. « PDMS Absorption of Small Molecules and Consequences in Microfluidic Applications ». *Lab on a Chip* 6 (12): 1484. https://doi.org/10.1039/b612140c.

Uchino, Shigeo, et Chikako Waga. 2013. « SHANK3 as an Autism Spectrum Disorder-Associated Gene ». *Brain and Development* 35 (2): 106-10. https://doi.org/10.1016/j.braindev.2012.05.013.

Urrestizala-Arenaza, Nerea, Sonia Cerchio, Fabio Cavaliere, et Chiara Magliaro. 2024. « Limitations of human brain organoids to study neurodegenerative diseases: a manual to survive ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 18 (juillet):1419526. https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1419526.

Van Den Berg, Albert, Christine L. Mummery, Robert Passier, et Andries D. Van Der Meer. 2019. « Personalised Organs-on-Chips: Functional Testing for Precision Medicine ». *Lab on a Chip* 19 (2): 198-205. https://doi.org/10.1039/C8LC00827B.

Van Den Heuvel, Martijn P., et Olaf Sporns. 2013. « Network Hubs in the Human Brain ». *Trends in Cognitive Sciences* 17 (12): 683-96. https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.09.012.

Van Kerkoerle, Timo, Sally A. Marik, Stephan Meyer Zum Alten Borgloh, et Charles D. Gilbert. 2018. « Axonal Plasticity Associated with Perceptual Learning in Adult Macaque Primary Visual Cortex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (41): 10464-69. https://doi.org/10.1073/pnas.1812932115.

Venzac, Bastien, Yang Liu, Ivan Ferrante, Pablo Vargas, Ayako Yamada, Rémi Courson, Marine Verhulsel, Laurent Malaquin, Jean-Louis Viovy, et Stéphanie Descroix. 2020. « Sliding Walls: A New Paradigm for Fluidic Actuation and Protocol Implementation in Microfluidics ». *Microsystems & Nanoengineering* 6 (1): 18. https://doi.org/10.1038/s41378-019-0125-7.

Virlogeux, Amandine, Eve Moutaux, Wilhelm Christaller, Aurélie Genoux, Julie Bruyère, Elodie Fino, Benoit Charlot, Maxime Cazorla, et Frédéric Saudou. 2018. « Reconstituting Corticostriatal Network On-a-Chip Reveals the Contribution of the Presynaptic Compartment to Huntington's Disease ». *Cell Reports* 22 (1): 110-22. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.013.

Virlogeux, Amandine, Chiara Scaramuzzino, Sophie Lenoir, Rémi Carpentier, Morgane Louessard, Aurélie Genoux, Patricia Lino, et al. 2021. « Increasing Brain Palmitoylation Rescues Behavior and Neuropathology in Huntington Disease Mice ». *Science Advances* 7 (14): eabb0799. https://doi.org/10.1126/sciadv.abb0799.

Vogt, Angela K, Günter Wrobel, Wolfgang Meyer, Wolfgang Knoll, et Andreas Offenhäusser. 2005. « Synaptic Plasticity in Micropatterned Neuronal Networks ». *Biomaterials* 26 (15): 2549-57. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.031.

Vunjak-Novakovic, Gordana, Kacey Ronaldson-Bouchard, et Milica Radisic. 2021. « Organs-on-a-Chip Models for Biological Research ». *Cell* 184 (18): 4597-4611. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.005.

Waldbaur, Ansgar, Holger Rapp, Kerstin Länge, et Bastian E. Rapp. 2011. « Let There Be Chip—towards Rapid Prototyping of Microfluidic Devices: One-Step Manufacturing Processes ». *Analytical Methods* 3 (12): 2681. https://doi.org/10.1039/c1ay05253e.

Wang, Yilin, Penghu Wei, Feng Yan, Yumin Luo, et Guoguang Zhao. 2022. « Animal Models of Epilepsy: A Phenotype-Oriented Review ». *Aging and Disease* 13 (1): 215. https://doi.org/10.14336/AD.2021.0723.

Wevers, Nienke R., Remko Van Vught, Karlijn J. Wilschut, Arnaud Nicolas, Chiwan Chiang, Henriette L. Lanz, Sebastiaan J. Trietsch, Jos Joore, et Paul Vulto. 2016. « High-Throughput Compound Evaluation on 3D Networks of Neurons and Glia in a Microfluidic Platform ». *Scientific Reports* 6 (1): 38856. https://doi.org/10.1038/srep38856.

White, JG. 1986. « The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis Elegans* ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 314 (1165): 1-340. https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056.

Whitesides, George M. 2006. « The Origins and the Future of Microfluidics ». *Nature* 442 (7101): 368-73. https://doi.org/10.1038/nature05058.

Wilson, Cj, et Y Kawaguchi. 1996. « The Origins of Two-State Spontaneous Membrane Potential Fluctuations of Neostriatal Spiny Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 16 (7): 2397-2410. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-07-02397.1996.

Wise, R A. 1996. « Addictive Drugs and Brain Stimulation Reward ». *Annual Review of Neuroscience* 19 (1): 319-40. https://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.001535.

Wolfram, Verena, et Richard A. Baines. 2013. « Blurring the Boundaries: Developmental and Activity-Dependent Determinants of Neural Circuits ». *Trends in Neurosciences* 36 (10): 610-19. https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.06.006.

Wong, P.K., T.-H. Wang, J.H. Deval, et C.-M. Ho. 2004. « Electrokinetics in Micro Devices for Biotechnology Applications ». *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics* 9 (2): 366-76. https://doi.org/10.1109/TMECH.2004.828659.

Wu, Jessica W, S Abid Hussaini, Isle M Bastille, Gustavo A Rodriguez, Ana Mrejeru, Kelly Rilett, David W Sanders, et al. 2016. « Neuronal Activity Enhances Tau Propagation and Tau Pathology in Vivo ». *Nature Neuroscience* 19 (8): 1085-92. https://doi.org/10.1038/nn.4328.

Xia, Younan, et George M. Whitesides. 1998. « SOFT LITHOGRAPHY ». *Annual Review of Materials Science* 28 (1): 153-84. https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.28.1.153.

Yang, Bocong, Boxiong Wang, et Werner Karl Schomburg. 2010. « A thermopneumatically actuated bistable microvalve ». *Journal of Micromechanics and Microengineering* 20 (9): 095024. https://doi.org/10.1088/0960-1317/20/9/095024.

Yin, Henry H., et Barbara J. Knowlton. 2006. « The Role of the Basal Ganglia in Habit Formation ». *Nature Reviews Neuroscience* 7 (6): 464-76. https://doi.org/10.1038/nrn1919.

Yu, Yifan, TingTing Zhou, et Liu Cao. 2023. « Use and Application of Organ-on-a-Chip Platforms in Cancer Research ». *Journal of Cell Communication and Signaling* 17 (4): 1163-79. https://doi.org/10.1007/s12079-023-00790-7.

Zeng, Ke, Jiannan Kang, Gaoxiang Ouyang, Jingqing Li, Junxia Han, Yao Wang, Estate M. Sokhadze, Manuel F. Casanova, et Xiaoli Li. 2017. « Disrupted Brain Network in Children with Autism Spectrum Disorder ». *Scientific Reports* 7 (1): 16253. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16440-z.

Zhang, Ying, Chi-Wei Lo, J. Ashley Taylor, et Shu Yang. 2006. « Replica Molding of High-Aspect-Ratio Polymeric Nanopillar Arrays with High Fidelity ». *Langmuir* 22 (20): 8595-8601. https://doi.org/10.1021/la061372+.

Zhang, Yu Shrike, Julio Aleman, Su Ryon Shin, Tugba Kilic, Duckjin Kim, Seyed Ali Mousavi Shaegh, Solange Massa, et al. 2017. « Multisensor-Integrated Organs-on-Chips Platform for Automated and Continual in Situ Monitoring of Organoid Behaviors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (12). https://doi.org/10.1073/pnas.1612906114.

Zhao, Xiaobei, Xu-Qiao Chen, Eugene Han, Yue Hu, Paul Paik, Zhiyong Ding, Julia Overman, et al. 2016. « TRiC Subunits Enhance BDNF Axonal Transport and Rescue Striatal Atrophy in Huntington's Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (38). https://doi.org/10.1073/pnas.1603020113.

Zhao, Yimeng, Xuefei Lv, Xiaoqiong Li, Nino Rcheulishvili, Yu Chen, Zhe Li, et Yulin Deng. 2023. « Microfluidic Actuated and Controlled Systems and Application for Lab-on-Chip in Space Life Science ». *Space: Science & Technology* 3 (janvier):0008. https://doi.org/10.34133/space.0008.

Zhao, Zixuan, Xinyi Chen, Anna M. Dowbaj, Aleksandra Sljukic, Kaitlin Bratlie, Luda Lin, Eliza Li Shan Fong, et al. 2022. « Organoids ». *Nature Reviews Methods Primers* 2 (1): 94. https://doi.org/10.1038/s43586-022-00174-y.

Zlokovic, Berislav V. 2008. « The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders ». *Neuron* 57 (2): 178-201. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003.