POLYPUBLIE
Polytechnique Montréal

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
UNIVERSITÉ D'INGÉNIERIE

Titre: Title: Tumeurs micro-disséquées sur puce microfluidique

Auteur: Author: Mélina Astolfi

Date: 2015

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Citation: Astolfi, M. (2015). Tumeurs micro-disséquées sur puce microfluidique [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/1846/

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: PolyPublie URL: https://publications.polymtl.ca/1846/

Directeurs de recherche: Advisors: Thomas Gervais, & Anne-Marie Mes-Masson

Programme: Program: Génie biomédical

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal

https://publications.polymtl.ca

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

TUMEURS MICRO-DISSÉQUÉES SUR PUCE MICROFLUIDIQUE

MÉLINA ASTOLFI

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

(GÉNIE BIOMÉDICAL)

JUIN 2015

© Mélina Astolfi, 2015.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

TUMEURS MICRO-DISSÉQUÉES SUR PUCE MICROFLUIDIQUE

présenté par : ASTOLFI Mélina

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. LESAGE Frédéric, Ph. D., président

M. GERVAIS Thomas, Ph. D., membre et directeur de recherche

Mme MES-MASSON Anne-Marie, Ph. D., membre et codirectrice de recherche

Mme CHERIET Farida, Ph. D., membre

DÉDICACE

Aux combattants du cancer, actuels et passés,
ainsi qu'à leurs proches

REMERCIEMENTS

Il y a tellement de personnes à remercier qui ont rendu possibles tous les accomplissements rapportés dans ce mémoire.

J'aimerais commencer par remercier mon directeur, Thomas Gervais, qui m'a continuellement motivée à me surpasser et à voir le côté positif de mes résultats de recherche. Il m'a aussi encouragée à présenter mes résultats à des conférences scientifiques, tant au niveau local qu'international, ce qui m'a permis de mieux m'approprier le projet et de recueillir les commentaires et suggestions de mes pairs. Je tiens aussi à remercier ma co-directrice, Anne-Marie Mes-Masson, qui m'a aidée à saisir les subtilités biologiques du projet et qui m'a chaleureusement accueillie au sein de son laboratoire. J'ai bénéficié de ses collaborations précieuses avec Dre Diane Provencher et Dr Fred Saad, des chirurgiens-oncologues du CHUM qui ont participé à l'élaboration de notre projet afin qu'il réponde le mieux possible aux besoins des patients.

Au laboratoire du CRCHUM, j'ai eu la chance de travailler avec une équipe qui avait à cœur de faire avancer ce nouveau projet. En particulier, Benjamin Péant m'a aidée à accomplir les premières étapes critiques d'optimisation de la technique de coupe du tissu et il a souvent proposé des améliorations qui se sont avérées utiles à l'avancement du projet. J'ai aussi travaillé de concert avec Jennifer Kendall-Dupont, entre autres pour développer la technique d'imagerie. Abdul Lateef a quant à lui mis au point la procédure de cytométrie en flux. Tous ensemble avec Euridice Carmona qui s'est plus récemment jointe à l'équipe, nous avons planifié et exécuté de nombreuses expériences visant à valider différentes étapes de la technique en développement. Pendant mon séjour à l'étranger et pendant ma période de rédaction, cette équipe exceptionnelle a continué de produire des résultats importants, dont certains ont servi à compléter les figures présentées dans ce mémoire. Il ne faut pas non plus oublier le travail essentiel des techniciennes et assistantes de recherche, en particulier Kim Leclerc Désaulniers, Lise Portelance et Manon de Ladurantaye, qui ont aidé à l'exécution de certaines procédures et assuré le bon fonctionnement du laboratoire. J'aimerais aussi reconnaître le travail des stagiaires qui ont travaillé de près avec l'équipe microfluidique du CRCHUM et avec moi, permettant de faire progresser plusieurs aspects du projet.

Au laboratoire de Polytechnique, je tiens à remercier Nassim Rousset qui m'a grandement aidée à améliorer ma compréhension des phénomènes microfluidiques se produisant dans nos

systèmes grâce à ses explications et aux simulations numériques qu'il a produites. Également, j'apprécie l'aide de Mohana Marimuthu et d'Amélie St-Georges qui ont toutes deux pris le temps de me conseiller et de m'enseigner à utiliser certains instruments.

J'ai de plus eu l'opportunité de travailler pendant quelques mois à l'étranger au sein de l'équipe de Sabeth Verpoorte, à l'Université de Groningue aux Pays-Bas. Je veux la remercier d'avoir eu confiance en mes capacités de chercheuse et d'avoir mis à ma disposition toutes les ressources nécessaires à l'exécution de mes expériences. Je conserve de beaux souvenirs de ce séjour pendant lequel j'ai évolué avec des gens qui m'ont si chaleureusement intégrée à leur groupe de recherche.

Enfin, je veux remercier de tout cœur mes proches, en particulier mes parents, qui m'ont soutenue tout au long de mes études et m'ont toujours encouragée à poursuive mes objectifs les plus ambitieux. Je dois un grand merci à Olivier Battistin, mon complice de tous les jours, qui s'est montré à l'écoute et m'a aidée à passer au travers du processus de rédaction grâce à sa bonne humeur contagieuse.

Pour terminer, j'aimerais souligner le support financier que j'ai reçu via plusieurs bourses de recherche : bourse d'études supérieures Alexander Graham Bell du Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie (CRSNG), bourse de maîtrise du Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT), suppléments de bourse pour études à l'étranger Michael Smith du CRSNG et bourse de voyage pour stagiaires de l'organisme Cancer de l'ovaire Canada. D'autres organismes subventionnaires ont financé le projet dans son ensemble : le Consortium québécois de la recherche du médicament et la fondation Cancer de la Prostate Canada.

RÉSUMÉ

Le cancer est une maladie complexe et très difficile à éliminer, en grande partie en raison des nombreux types différents de cancers et du caractère unique de chaque individu, faisant en sorte que les patients répondent différemment à la gamme grandissante de traitements disponibles. D'associer à chaque patient le meilleur traitement possible constitue l'un des grands défis de la médecine personnalisée d'aujourd'hui. Cela permettra d'éviter les effets secondaires et les coûts liés à des traitements inefficaces. En même temps, les chances de succès seront plus élevées puisqu'en appliquant le traitement optimal plus tôt, le cancer aura moins le temps de développer les mécanismes de résistance qui le rendent de plus en plus difficile à traiter. Cependant, les modèles actuels de culture de cellules cancéreuses ne permettent pas de recréer parfaitement toutes les caractéristiques des patients qui seront ultimement traités par les chimiothérapies testées. Les modèles animaux ne répliquent pas bien le système immunitaire humain, ni la complexité et l'instabilité génétique des cancers humains alors que la plupart des modèles de culture *in vitro* négligent en plus le caractère tridimensionnel (3D) du tissu. Les sphéroïdes – des amas cellulaires tridimensionnels synthétisés en laboratoire – sont un modèle de tissu simple et prometteur, mais ceux formés à partir de lignées cellulaires établies ne reproduisent pas bien la complexité et les particularités des cancers de patients.

L'objectif de ce projet est de proposer une procédure permettant d'effectuer des tests de réponses aux chimiothérapies directement sur le tissu tumoral de patients, extrait par biopsie ou par chirurgie. En préservant l'architecture 3D et la composition cellulaire du tissu primaire, cette technique a le potentiel de mieux prédire la réponse du patient comparativement aux autres méthodes de culture des cellules. L'approche retenue consiste à miniaturiser les échantillons ainsi que le dispositif dans lequel ils sont gardés en culture, ce qui lui confère des avantages importants relatifs au contexte clinique dans lequel le projet s'inscrit. Premièrement, en coupant petit, il est possible d'obtenir plusieurs échantillons à partir d'une quantité minime de tissu, lesquels pourront ensuite être exposés à différentes options de traitements. Deuxièmement, en employant un système microfluidique comme dispositif d'incubation, le volume est grandement réduit, minimisant par le fait même les coûts en réactifs (par exemple, les chimiothérapies ou les marqueurs fluorescents). Enfin, la petite taille des systèmes réduit les temps de diffusion, ce qui facilite le transport d'oxygène, de nutriments et d'autres molécules jusqu'au centre du tissu.

Quatre différents types de tumeurs de souris, formées après l'injection de cellules de cancers de la prostate et de l'ovaire, ont été utilisés dans ce projet comme modèle de tissu tumoral pour mettre au point toutes les étapes de la procédure. D'abord, une technique de découpe du tissu à des tailles sous-millimétriques a été développée afin de produire de nombreux échantillons de tumeurs micro-disséquées (TMD), à partir de faibles quantités de tissu primaire. En forme de disque d'environ 300 µm de haut par 380 µm de diamètre, les TMD ont été produites en utilisant un vibratome pour couper de fines tranches de tissu ainsi qu'un poinçon à biopsie pour réduire leurs dimensions au diamètre désiré. Ensuite, les TMD ont été chargées dans une plateforme microfluidique conçue sur mesure, composée de cinq canaux indépendants, chacun muni de cinq puits où les TMD sont piégées par sédimentation. Pour évaluer la viabilité des TMD au sein de cette plateforme, trois techniques de mesure ont été adaptées à la procédure développée : 1) la microscopie confocale des cellules viables et mortes marquées avec des fluorophores de viabilité faite directement à travers le dessous de la plateforme, 2) la cytométrie en flux des échantillons fragmentés en cellules individuelles marquées avec des fluorophores d'apoptose et 3) la détection d'un biomarqueur de mortalité dans le milieu extrait des systèmes.

Les trois techniques d'analyse montrent que les quatre types de TMD restent viables tout au long de la période d'incubation sur huit jours. Leur viabilité est généralement plus faible après la première journée d'incubation à cause du stress causé par la procédure de coupe sur les tissu, mais un regain de viabilité survient dès le troisième jour et est maintenu jusqu'au dernier jour d'analyse. Le même protocole a été appliqué avec succès à du tissu de cancer de l'ovaire extrait d'une patiente par intervention chirurgicale et l'effet d'une chimiothérapie (le carboplatine) sur la survie du tissu a été évalué. Le tissu semble avoir répondu positivement au traitement puisqu'une viabilité significativement plus basse a été mesurée pour les TMD traitées comparativement à celles non traitées.

Les résultats montrent que des échantillons primaires de tumeur peuvent être maintenus en vie au sein de la plateforme microfluidique suffisamment longtemps pour mesurer les effets de différents traitements sur plusieurs jours. La technologie développée a le potentiel de repositionner les patients au centre du développement de médicaments en servant d'interface entre leur tissu cancéreux et toutes les possibilités de traitements qui s'offrent à chacun d'eux. Elle pourra aussi servir pour certaines étapes clés de la recherche fondamentale où des tests sur du tissu humain

pourraient permettre de répondre à certaines questions jusqu'ici peu explorées en raison de l'absence d'un modèle tissulaire approprié.

Mots clés : modèles de culture cellulaire, culture organotypique, tissu primaire, microfluidique, phénomènes d'échanges sur puce, organes-sur-puce, cancer, médecine personnalisée, tests de réponse aux médicaments.

ABSTRACT

Cancer is a complex disease and very difficult to eradicate, mainly because there are many different subtypes of cancer and each individual responds differently to the increasing number of available treatments. Associating the best treatment to each and every patient is one of the greatest challenges of personalized medicine today. Personalizing treatment will enable doctors to avoid the side effects and costs related to inefficient treatments. At the same time, therapy success rates will increase by applying an efficient treatment earlier when the disease has not yet had time to develop resistance mechanisms making it more difficult to treat. However, currently available cancer cell culture models do not perfectly recreate all the characteristics of patients' tumors that will ultimately be treated by the tested therapeutics. Animal models do not replicate the human immune system, nor the complexity and instability of human cancers, while most *in vitro* models also neglect the three dimensionality of tissue. Spheroids – laboratory-synthesized three dimensional (3D) clusters of cells – constitute a simple and promising tissue model, but those grown from established cell lines do not reproduce the complexity and characteristics of specific patients' cancers.

The aim of the current research is to propose a new procedure whereby different drugs could be tested directly on tumor tissue extracted from patients through biopsy or surgery. By preserving the 3D architecture and cellular composition of primary tissue, this technique could potentially offer better prediction of patients' response compared to other cell culture models. The chosen approach, which consists in miniaturizing the tissue samples and the device in which they are cultured, has many important advantages relative to the clinical application of the project. First, by cutting the tissue into small pieces, many samples are obtained from a small quantity of tissue which can then be exposed to different treatment options. Second, through the use of a microfluidic system as an incubation device, the volume is reduced, thereby minimizing the cost of reagents (for example, chemotherapy agents or fluorescent markers). Finally, the small size of the systems reduces diffusion times, which facilitates the transport of oxygen, nutrients and other molecules to the center of the tissue.

Four different types of mouse tumor xenografts – grown from human prostate and ovarian cancer cell lines – were used to establish all the steps of the procedure. First, a cutting technique was developed to produce many submillimeter-sized micro-dissected tumor samples (MDTs) from

small amounts of primary tissue. Disk-like MDTs of approximately 380 µm in diameter by 300 µm high were produced using a vibratome to cut thin slices of agar-embedded tissue followed by a biopsy punch to reduce their size to the desired diameter. Next, the MDTs were loaded into a custom designed microfluidic platform composed of five independent channels, each containing five wells where the MDTs were trapped by sedimentation. To assess MDT viability in this platform, three measurement techniques have been adapted to the procedure: 1) confocal microscopy live and dead cells labeled with viability dyes performed directly through the base of the platform, 2) flow cytometry of samples disrupted into individual cells labeled with apoptosis fluorophores, and 3) the detection of a biomarker for mortality measured in the medium extracted from the systems.

All three analytical techniques show that the four types of MDTs remain viable throughout the incubation period over eight days. Their viability is generally lower after the first day of incubation because of stress exerted on the tissue during the cutting procedure, but viability recovers by the third day and is maintained until the last day of analysis. The same protocol was successfully applied to ovarian cancer tissue removed from a patient during surgery and the effect of a chemotherapy agent (carboplatin) on the survival of the tissue was assessed. The cancer tissue seems to have responded positively to the treatment since significantly lower viabilities were measured for treated MDTs compared to the untreated group.

These results show that primary tumor samples can be kept alive within the microfluidic platform long enough to measure the effects of different treatments over several days. The technology developed has the potential to reposition patients at the center of the drug development pipeline by serving as an interface between their primary cancerous tissue and the treatment options available to each of them. It may also be used in certain key basic research steps where tests on human tissue could help to address questions that remain unanswered up to now due to the absence of an appropriate tissue model.

Keywords: cell culture models, organotypic culture, primary tissue, microfluidics, transport phenomena on chip, organs-on-chip, cancer, personalized medicine, drug testing.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE III

REMERCIEMENTS IV

RÉSUMÉ VI

ABSTRACT IX

TABLE DES MATIÈRES XI

LISTE DES TABLEAUX XIV

LISTE DES FIGURES XV

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS XVIII

LISTE DES ANNEXES XX

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1

CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE 12

2.1 Découpe de tissus à des tailles sous-millimétriques 12

2.1.1 Prétraitement du tissu 12

2.1.1.1 Production de xénogreffes de souris 12

2.1.1.2 Réception de tissu tumoral humain 13

2.1.2 Procédure de découpe du tissu cancéreux 13

2.2 Plateformes microfluidiques à piégeage par sédimentation 14

2.2.1 Conception 14

2.2.2 Fabrication 16

2.2.3 Mode d'opération 17

2.3 Analyse de viabilité des TMD 19

2.3.1 Microscopie confocale 19

2.3.1.1 Marquage des échantillons avec des fluorophores de viabilité et de mortalité 21

2.3.1.2 Acquisition d'images au centre de microscopie du CRCHUM 22

2.3.1.3 Algorithme d'analyse d'images 23

2.3.2 Cytométrie en flux.....24

2.3.3 Sécrétion du marqueur de mortalité lactate déshydrogénase (LDH) 26

2.3.3.1 Particularités du test LDH effectué au CRCHUM 27

CHAPITRE 3 CULTURE SUR PUCE DE TUMEURS MICRO-DISSÉQUÉES..... 29

3.1 Découpe de tumeurs à des tailles sous-millimétriques.....29

3.2 Caractérisation de la plateforme microfluidique 31

3.2.1 Mécanisme de piégeage des TMD 31

3.2.1.1 Critère 1 : densité des TMD 31

3.2.1.2 Critère 2 : temps de convection des TMD au-dessus du puits 34

3.2.2 Contraintes de cisaillement 35

3.2.3 Stabilité des TMD dans les puits microfluidiques 37

3.2.4 Transport d'oxygène et de nutriments sans perfusion.....39

3.2.4.1 Calcul du rayon critique d'un tissu tumoral sphérique pour éviter l'anoxie.....40

3.2.4.2 Autres considérations sur la consommation de nutriments par les TMD 46

3.3 Viabilité sur puce des tumeurs micro-disséquées 47

3.3.1 Analyse de viabilité par microscopie confocale.....48

3.3.2 Analyse de viabilité par cytométrie en flux 49

3.3.3 Analyse de sécrétion du marqueur de mortalité LDH.....51

3.4 Effets de chimiothérapies sur des TMD de tissu primaire de patients 53

CHAPITRE 4 DÉVELOPPEMENT DES TECHNIQUES DE PIÉGEAGE ET D'ANALYSE D'IMAGES EN FLUORESCENCE 57

4.1 Processus itératif de design de la plateforme microfluidique 57

4.1.1 Piégeage résistif.....57

4.1.2 Piégeage par sédimentation 59
4.2 Algorithme de segmentation d'images fluorescentes 62
4.2.1 Performance de l'algorithme 62
4.2.1.1 Module de débruitage 63
4.2.1.2 Module d'égalisation du signal 63
4.2.1.3 Module de détection des contours 65
4.2.1.4 Module de segmentation 67
4.2.2 Limites de l'algorithme 68
4.2.2.1 Calcul de viabilité 69
4.2.2.2 Causes de rejet de séquences d'images 70
CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE 74
5.1 Synthèse des principaux résultats 74
5.1.1 Technique de découpe des tumeurs micro-disséquées 74
5.1.2 Comparaison des méthodes de piégeage des TMD 75
5.1.3 Méthodes d'analyse de viabilité 77
5.1.3.1 Étude de corrélation entre les résultats de viabilité mesurés par microscopie confocale et par cytométrie en flux 80
5.1.4 Tests de chimiothérapie sur puce 84
5.2 Défis à surmonter 84
CHAPITRE 6 CONCLUSION 88
LISTE DE RÉFÉRENCES 89
ANNEXES 96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1: Vitesses de sédimentation dans un milieu infini, approximation de densités relatives par rapport au HBSS et de densités absolues pour différents types de tissus 33

Tableau 3.2: Description des variables pour le calcul de la concentration d'oxygène dans un échantillon de tissu tumoral et dans le milieu environnant 41

Tableau 4.1: Causes possibles de variation d'intensité des cellules marquées et description de leurs effets 64

Tableau 4.2: Raisons de rejet de séquences d'images segmentées par l'algorithme en fonction du type de xénogreffe imagé 70

Tableau 5.1 : Avantages et désavantages des trois méthodes étudiées pour mesurer la viabilité des TMD 78

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Diagramme de l'approche proposée pour orienter le choix de traitement anti-cancer en médecine personnalisée 7

Figure 2.1: Procédure de découpe du tissu cancéreux pour l'insertion dans les systèmes microfluidiques 14

Figure 2.2: Conception de la plateforme microfluidique 15

Figure 2.3: Moules utilisés pour fabriquer les plateformes microfluidiques. 16

Figure 2.4: Assemblage de la plateforme microfluidique 17

Figure 2.5: Aperçu de la procédure pour changer le milieu et en collecter des fractions 19

Figure 2.6: Principe de sectionnement optique en microscopie confocale 20

Figure 2.7: Mécanismes d'action des deux fluorophores utilisés pour distinguer les cellules viables des cellules mortes 21

Figure 2.8: Spectres d'excitation et d'émission associés au CTG et au PI 23

Figure 2.9: Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux 25

Figure 2.10: Principe de fonctionnement du test de détection du marqueur de mortalité LDH 26

Figure 2.11: Justification du temps de demi-vie utilisé pour corriger les mesures de LDH 27

Figure 3.1: Diamètres des TMD mesurés sur les projections maximales des séquences d'images acquises par microscopie confocale 30

Figure 3.2: Définition des variables et des dimensions du système pour le calcul de la contrainte de cisaillement maximale 35

Figure 3.3: Profil de la concentration d'oxygène à l'intérieur et autour d'un échantillon sphérique de tissu en fonction du rayon tel que défini dans les deux sous-domaines du problème 45

Figure 3.4: Compilation des résultats de viabilité des TMD de quatre types de xénogreffes de souris, mesurés par microscopie confocale sur une période de huit jours suivant la récolte 49

Figure 3.5: Compilation des résultats de viabilité des TMD de quatre types de xénogreffes de souris, mesurés par cytométrie en flux sur une période de huit jours suivant la récolte 50

Figure 3.6: Taux de mortalité des TMD formées des quatre types de xénogreffes, mesurés comme des taux de sécrétion du biomarqueur de mortalité LDH sur une période de huit jours suivant la récolte 52

Figure 3.7: Évaluation de l'effet de la carboplatine sur des TMD de tissu tumoral extrait d'une patiente atteinte du cancer de l'ovaire 55

Figure 4.1: Mécanisme de piégeage résistif 58

Figure 4.2: Problèmes de chargement et de manipulation des échantillons dans la plateforme multiplexée à piégeage résistif 59

Figure 4.3: Évolution du design des microsystèmes à piégeage par sédimentation 60

Figure 4.4: Comparaison du fini de surface des systèmes selon la méthode de fabrication du moule 61

Figure 4.5: Exemple d'exécution du module d'égalisation appliqué au signal vert d'une TMD .. 65

Figure 4.6: Exemple d'exécution du module de détection des contours appliqué au signal vert d'une TMD 66

Figure 4.7: Exemple d'exécution de l'algorithme de segmentation sur les signaux vert et rouge d'une TMD 68

Figure 4.8: Exemple d'image avec bruit de fond vert élevé et segmentations erronées résultantes 71

Figure 4.9: Exemple d'image où l'absence de signal rouge provoque une segmentation erronée 72

Figure 4.10: Autres exemples d'images rejetées de l'analyse 73

Figure 5.1: Graphique de corrélation entre les données de viabilité mesurées en microscopie confocale et en cytométrie en flux 81

Figure 5.2: Graphique de corrélation entre les données de viabilité mesurées en microscopie confocale et en cytométrie en flux après l'ajout des points de faible viabilité 83

Figure A.1: Production de tranches de tissu de foie (PCLS) 97

Figure A.2: Procédure de coupe des tranches de tissu de foie pour l'insertion dans les systèmes microfluidiques.....98

Figure A.3: Incubateur maison utilisé pour cultiver les TMDF 99

Figure A.4: Spectres d'excitation à deux photons et d'émission de fluorescence associés pour le PI et la fluorescéine (FITC) 103

Figure A.5: Taux de mortalité pour les TMDF de foie de rat et pour les PCLS mesurés comme des taux de sécrétion du biomarqueur de mortalité LDH sur une période de 45 heures après le début de l'incubation 107

Figure A.6: Taux de sécrétion de LDH en fonction du temps pour des PCLS d'expériences antérieures 108

Figure A.7: Viabilité des TMDF après 24 et 45 heures d'incubation, mesurée par microscopie confocale sur les échantillons marqués à la calcéine AM et au PI.....109

Figure A.8: Comparaison de la profondeur d'imagerie de la microscopie à deux photons par rapport à celle de la microscopie confocale 111

Figure A.9: Images d'un échantillon de tissu de foie non marqué, excité à différentes longueurs d'onde allant de 780 à 1000 nm 112

Figure A.10: Effet du mouvement sur la qualité de l'image 113

Figure A.11: Rythme de formation des métabolites de la 7-HC à différentes périodes d'incubation pour des TMDF dans les microsystèmes ou pour des PCLS dans une plaque à 12 puits 115

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

2D	Deux dimensions ou bidimensionnel(le)
3D	Trois dimensions ou tridimensionnel(le)
7-EC	7-ethoxycoumarine, composante utilisée pour étudier le métabolisme de phase I du foie
7-HC	7-hydroxycoumarine, métabolite de la 7-EC et composante utilisée pour étudier le métabolisme de phase II du foie
7-HC-G	Forme glucuronisée de la 7-HC (métabolite de phase II)
7-HC-S	Forme sulfatée de la 7-HC (métabolite de phase II)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance, en anglais : *high-performance liquid chromatography (HPLC)*
CRCHUM	Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CRSNG	Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie
CTG	CellTracker® Green CMFDA, marqueur fluorescent vert des cellules viables
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole, agent intercalant d'ADN qui marque en bleu toutes les cellules viables et mortes
DRAQ5™	*1,5-bis{[2-(di-methylamino) ethyl]amino}-4, 8-dihydroxyanthracene-9,10-dione*, agent intercalant d'ADN qui marque en rouge lointain toutes les cellules viables et mortes
FBS	Sérum de veau fœtal, de l'anglais : *fetal bovine serum*, supplément de milieu

FRQNT	Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies
HBSS	De l'anglais : *Hank's Buffered Saline Solution*, solution saline de préservation utilisée pour le tissu cancéreux
LMP	De l'anglais : *low melting point*, se dit de l'agarose à faible point de fusion.
OSE	De l'anglais : *ovarian surface epithelial*, se dit du milieu utilisé pour incuber le tissu cancérieux ovarien
RPMI 1640	Développé au *Roswell Park Memorial Institute*, se dit du milieu utilisé pour incuber le tissu cancéreux de prostate
PDMS	Polydiméthylsiloxane, élastomère transparent utilisé pour fabriquer les plateformes microfluidiques
PI	Iodure de propidium, de l'anglais *propidium iodide*, agent intercalant de l'ADN qui marque en rouge les cellules mortes seulement
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle, plastique transparent
PCLS	Tranches de foie de rat, de l'anglais *precision-cut liver slices*, d'un diamètre de 4 à 5 mm et d'une épaisseur de 250 µm.
TMD	Tumeur micro-disséquée (en anglais : *micro-dissected tumor (MDT)*)
TMDF	Tissu micro-disséqué de foie
UMCG	*University Medical Center of Groningen*, centre médical universitaire de la ville de Groningue, aux Pays-Bas.
UW	« *University of Wisconsin* », décrit le milieu de préservation utilisé pour le tissu de foie de rat.
WME	De l'anglais : *William's Medium E*, se dit du milieu d'incubation pour les TMDF de foie.

LISTE DES ANNEXES

Annexe A – Culture sur puce de micro-fragments de foie.....96

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Le cancer, la maladie la plus meurtrière au Canada, est responsable de 30% de tous les décès [1], et ce, malgré la multitude de traitements disponibles. Si les techniques de diagnostic et de soin ne sont pas significativement améliorées, il faut s'attendre à ce que plus de deux personnes sur cinq soient atteintes du cancer au cours de leur vie et à ce qu'une personne sur quatre décède de cette maladie. La variabilité de la réponse des patients aux médicaments [2] et l'épuisement des patients et des proches [3] face au fardeau de la maladie et à l'application de thérapies parfois inefficaces pointent vers la nécessité d'une approche plus personnalisée de traitements. Ce projet a pour but de développer une nouvelle technique de culture de tissu tumoral qui pourrait être utilisée à la fois comme un modèle préclinique plus représentatif des tumeurs humaines pour le développement de nouveaux médicaments et éventuellement comme un test clinique pour prédire la réponse individuelle de patients aux traitements anti-cancer existants.

Au cours des 30 dernières années, la découverte de centaines de gènes et mutations impliqués dans l'évolution de différents types de cancers a radicalement changé l'approche du traitement de la maladie [4], [5]. Certaines prédispositions génétiques au cancer ont été identifiées et s'avèrent extrêmement utiles pour le suivi de patients à risque. Par exemple, une mutation d'un des deux gènes suppresseurs de tumeur BRCA1 ou BRCA2 augmente drastiquement chez les femmes le risque de développer un cancer du sein ou de l'ovaire au cours de leur vie [6]. Grâce à une compréhension améliorée des voies de signalisation menant à un comportement néoplasique des cellules, de nombreuses cibles thérapeutiques potentielles ont aussi été identifiées [4]. Or, à l'exception de quelques traitements qui ont eu un impact clinique significatif sur la survie de groupes de patients bien spécifiques, par exemple les inhibiteurs de PARP pour les personnes ayant des cancers BRCA-mutés [7], la plupart des patients ne peuvent toujours pas bénéficier de traitements ciblés.

Pour orienter le choix de thérapies anti-cancer, il existe donc deux grandes visions de la médecine personnalisée. La première, basée sur les statistiques, cherche à trouver un marqueur biologique (ou biomarqueur) chez les patients à traiter qui serait un indicateur d'une probabilité augmentée de réponse à certains médicaments. Actuellement, malgré une recherche intensive en ce sens, un très faible nombre de ces biomarqueurs a été répertorié et est utilisé en milieu clinique [4]. Les oncologues disposent donc de peu d'outils pour les aider à choisir la meilleure

chimiothérapie pour chaque patient. Par exemple, BRCA1 et BRCA2 sont des biomarqueurs indicateurs d'une probabilité augmentée de réponse aux inhibiteurs de PARP. Cependant, à cause du caractère spécifique de chaque individu, tous les patients BRCA-mutés ne répondent pas nécessairement à la thérapie proposée [7]. Pour compenser ces limites, la deuxième vision de la médecine personnalisée consiste plutôt à tester empiriquement différentes chimiothérapies sur du matériel biologique provenant de chaque individu atteint d'un cancer. Cette option est généralisable à plusieurs types de cancers et elle pourrait être tentée dans la majorité des cas où l'approche par les biomarqueurs se serait avérée peu concluante. Elle pourrait même être utilisée en complémentarité avec les biomarqueurs pour valider un choix de traitement basé sur ceux-ci.

Ce projet de maîtrise s'inscrit dans cette deuxième vision de la médecine personnalisée. Le matériel tumoral primaire peut être collecté sous plusieurs formes chez les patients atteints de cancer, notamment par les cellules tumorales circulantes, les ascites (l'accumulation de liquide dans l'abdomen pouvant contenir des cellules cancéreuses) et les tumeurs elles-mêmes. Bien que les deux premiers types soient les plus simples à extraire soit par une prise de sang ou par une paracentèse, ils ne sont présents que dans une faible proportion des patients et apparaissent généralement à un stade avancé de la maladie [8], [9]. En revanche, les cancers à tumeur solide composent environ 90% de tous les cancers [10]. Des échantillons de tumeur peuvent être obtenus par biopsie ou à la suite d'une procédure chirurgicale, et ce projet vise à démontrer que ces tumeurs solides peuvent être cultivées dans un microsystème conçu sur mesure et être utilisées comme un nouveau modèle de culture cellulaire plus représentatif de la complexité biologique du cancer.

Comme le témoigne le faible taux de succès – seulement 6,7% – des médicaments anti-cancer en phase clinique [11], les modèles précliniques actuels sont défaillants puisqu'ils ne permettent pas de prédire correctement quels médicaments devraient être rejetés des étapes subséquentes de développement, ni de déterminer pour quel sous-groupe de patients les nouveaux traitements ont le plus de chances de produire un effet positif [12]–[14]. En biologie du cancer, la lignée cellulaire établie est le modèle le plus communément étudié en raison de sa simplicité d'utilisation, de sa rapidité à produire des résultats, de la reproductibilité des résultats générés ainsi que de la disponibilité de plusieurs types de cellules bien caractérisées [14], [15]. À l'origine, les lignées cellulaires humaines ont toutes été dérivées de cellules extraites de patients, mais les conditions de propagation de ces cellules dans des boîtes de pétri sont très différentes du microenvironnement présent *in vivo* [15]. En effet, les cellules se reproduisent en monocouche sur

un substrat de plastique, sans être exposées aux composantes de la matrice extracellulaire normale. Cette configuration bidimensionnelle n'encourage pas les interactions cellulaires et moléculaires (sécrétion de facteurs de croissance, d'hormones, d'interleukines, expression de molécules d'adhésion, etc.) qui sont caractéristiques des tissus 3D [16], [17]. Après plusieurs passages, seulement un sous-groupe de cellules ayant réussi à s'adapter aux nouvelles conditions de culture est représenté dans la lignée cellulaire résultante.

Le modèle animal murin est aussi largement utilisé en étude préclinique du cancer tant pour la formation de xénogreffes que pour l'étude de la tumorigénèse grâce à des souris génétiquement modifiées. Les xénogreffes sont des masses cancéreuses produites en injectant des cellules tumorales humaines dans le flanc (sous-cutané) ou dans une région du corps pertinent au cancer étudié (orthotopique) de souris immunodéficientes [14], [15]. La formation de xénogreffes se fait relativement rapidement et de manière reproductible pour plusieurs types de lignées cellulaires, ce qui permet d'étudier l'effet de différentes thérapies sur le comportement des tumeurs (initiation, croissance, métastase) au sein d'une cohorte de plusieurs souris presque identiques. Elles ajoutent des dimensions intéressantes à l'étude du cancer : tridimensionnalité des tumeurs, vascularisation, interactions avec la matrice extracellulaire et le stroma des souris, puis exposition aux hormones et aux autres facteurs sécrétés par les souris localement ou de manière systémique [12], [15], [18]. Cependant, en plus des questions éthiques soulevées par ce type de culture, les souris immunodéficientes ne reproduisent pas le rôle important du système immunitaire dans la progression du cancer [12], [14]–[16]. Des cellules primaires de patients peuvent aussi être transplantées dans ce modèle, mais elles peuvent prendre beaucoup de temps à développer une masse cancéreuse et de surcroît, ne forment aucune xénogreffe dans une proportion importante de cas [14], [15]. Quant aux souris génétiquement modifiées, même si elles sont utiles pour étudier des voies de signalisations particulières impliquées dans le cancer, elles sont coûteuses à développer [14]. Enfin, autant les souris génétiquement modifiées que les xénogreffes ne représentent pas tous les types de cancers et ne reflètent pas suffisamment bien la complexité et l'instabilité génétique des carcinomes humains [12], [14], [15]. De plus, les résultats obtenus avec ces deux catégories de modèles murins resteront toujours affectés par les différences inter-espèces entre la souris et l'humain [15], [18].

La tridimensionnalité des tissus est de plus en plus reconnue comme un aspect important des modèles cellulaires [16]–[18]. Même si des défis subsistent concernant les modèles cellulaires

3D, en particulier la possibilité de les cultiver *in vitro* pendant de longues périodes et de les imager en profondeur [17], ils sont de plus en plus utilisés comme modèles alternatifs pour l'étude du cancer. Les sphéroïdes, soit des amas de cellules cancéreuses formés *in vitro*, sont actuellement largement étudiés pour mieux représenter la tridimensionnalité des tumeurs solides humaines. Les cellules cultivées dans des sphéroïdes ont été associées à des niveaux d'expression génique plus près des niveaux d'expression trouvés dans les tumeurs [19], [20]. La tridimensionnalité des sphéroïdes et de d'autres types de tissu 3D limite le transport massique diffusif de toutes les molécules consommées ou produites par les cellules comme les nutriments, les déchets cellulaires, ou d'autres molécules de signalisation sécrétées. Des gradients de différentes molécules telles l'oxygène se forment donc au sein du tissu, entraînant l'expression de phénotypes différents en fonction de la position des cellules dans le tissu, ce qui reproduit mieux la situation d'hétérogénéité retrouvée *in vivo* [16], [18]. Des modèles de sphéroïdes de plus en plus complexes composés d'un mélange de cellules cancéreuses et de cellules stromales sont également en développement pour refléter l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs humaines [16]. Toutefois, la complexité et les particularités des tissus humains demeurent inégalées par toutes les techniques de génie tissulaire actuellement disponibles. D'ailleurs, l'impossibilité de reproduire fidèlement toutes les spécificités (mutations génétiques, profil d'expression génique, microenvironnement, hétérogénéité, etc.) du cancer d'un patient en particulier limite grandement l'utilité en médecine personnalisée de ces modèles de culture 3D [21].

Au lieu de tenter de recréer la complexité des tissus tumoraux à partir de lignées cellulaires cultivées en 3D, une approche alternative de laquelle s'inspire ce projet de maîtrise consiste à cultiver directement le tissu extrait des patients [22]. Ce type de culture organotypique, c'est-à-dire qui préserve l'architecture de l'organe d'origine, permet aux différentes sous-populations cellulaires de continuer à se développer *ex vivo* au sein de leur matrice 3D originale. Malgré les difficultés liées à l'accès aux tissus de patients ainsi qu'à la viabilité limitée des échantillons produits, ce type de culture présente le meilleur potentiel de refléter *in vitro* la complexité et les spécificités des cancers humains [21], [22]. Il est généralement admis qu'en l'absence de vascularisation fonctionnelle, ces tissus doivent être coupés à des tailles sous-millimétriques, au moins dans une dimension, pour favoriser la diffusion de nutriments jusqu'au centre du tissu et assurer une viabilité globale acceptable. Tel est le cas, par exemple, pour les minces tranches de

tissu organotypique [22], [23] produites à l'aide d'un instrument qui contrôle précisément la hauteur de coupe, comme un vibratome.

En plus de faciliter le transport diffusif [18], la miniaturisation des procédés comporte de nombreux avantages. Des quantités minimes d'échantillon et de réactifs peuvent être employées [24]. Ceci constitue un avantage important pour l'application envisagée en médecine personnalisée puisque seulement de petits volumes d'échantillons biologiques primaires sont disponibles [25] et les composantes médicamenteuses testées sont souvent coûteuses [26]. Les petits volumes permettent aussi de concentrer les composantes sécrétées par les échantillons, ce qui est bénéfique à la fois pour préserver les processus de signalisation entre les cellules [18] et pour maintenir des concentrations détectables de certaines molécules à analyser [24]. De plus, une caractéristique importante des microsystèmes est que les fluides qui y circulent suivent un flux laminaire – donc sans turbulences – et la plupart du temps sans effets inertiels (écoulements dits de Stokes) [24], [27]. Le comportement du fluide et des particules y circulant est donc totalement déterministe et peut être décrit sous la forme d'une équation différentielle linéaire, ce qui le rend modélisable par des techniques analytiques classiques. Enfin, la miniaturisation permet de tester plusieurs conditions en parallèle sur de petites surfaces, ce qui réduit le nombre d'instruments nécessaires à l'analyse et facilite l'automatisation des procédés mis au point [24].

Il est possible de créer des structures tridimensionnelles sous-millimétriques pour la culture de cellules ou de tissus en employant différentes techniques de microfabrication. La photolithographie mise au point pour la microélectronique permet de graver avec précision dans un substrat de silicium un réseau miniature de tranchées et de trous où les cellules peuvent être cultivées. Plus communément, des techniques similaires sont employées pour créer des motifs surélevés sur des plaques de silicium servant ensuite de moule négatif pour produire plusieurs répliques du même dispositif en polydiméthylsiloxane (PDMS), un polymère flexible [18], [28]. Après le démoulage du morceau de PDMS comportant des motifs et son assemblage avec une lame de verre ou un morceau de PDMS lisse, un réseau de canaux microfluidiques est créé. D'autres techniques de microfabrication, comme l'impression 3D [29] et le micro-usinage contrôlé par ordinateur [30], peuvent aussi être employées pour produire des moules aux motifs plus larges. Le PDMS est biocompatible, transparent et perméable aux gaz, ce qui en fait un matériau idéal pour la culture de matériel biologique [31].

Tous les modèles cellulaires décrits ci-dessus ont déjà été cultivés au sein de puces microfluidiques faites sur mesure pour répondre aux besoins de différentes applications. Par exemple, des chercheurs ont conçu différentes configurations microfluidiques pour la culture de cellules en perfusion dynamique, imitant mieux la circulation sanguine autour des tumeurs [32], [33]. Pour en plus tenir compte de la tridimensionnalité des tissus, plusieurs techniques ont été proposées pour produire des sphéroïdes directement sur puce en vue de les exposer à différentes chimiothérapies [34]–[36]. D'autres ont plutôt opté pour la formation de sphéroïdes par des techniques plus traditionnelles, puis ont employé des microsystèmes pour piéger et effectuer des tests de réponse aux médicaments sur puce [30], [37]. En ce qui concerne les cellules primaires, plusieurs systèmes emploient des effets hydrodynamiques particuliers et des propriétés d'adhésion spécifiques aux cellules cancéreuses pour isoler les cellules tumorales circulantes des autres cellules sanguines [38]–[41]. Une étude récente par Peterson *et al.* [42] a vérifié l'expression de biomarqueurs dans des cellules cancéreuses d'ascites capturées dans un microsystème. Parallèlement, certains groupes ont démontré la faisabilité de cultiver directement sur puce de minces tranches de tissu vivant prélevés d'un animal [43], [44]. Toutefois, même si la plupart des cancers se forment dès leur initiation en masses solides, très peu de groupes de recherche ont développé des systèmes microfluidiques capables d'interroger des fragments de tissu cancéreux primaire. Hattersley *et al*. [45], [46] ont développé un système simple où des biopsies de patients d'environ 4 mm^3 ont été incubées avec une perfusion lente de milieu dans une chambre de 3 mm de diamètre, puis été exposées à des chimiothérapies. Des résultats intéressants de viabilité sur sept à neuf jours et de réponse aux traitements ont été obtenus, mais ceux-ci sont très variables et difficiles à interpréter. De plus, chaque plateforme ne peut accommoder qu'un échantillon exposé à une seule condition, ce qui risque de rendre la procédure ardue lorsque de nombreux échantillons doivent être traités simultanément et perfusés individuellement. Chang *et al.* [47] ont quant à eux développé un microsystème élégant basé sur le design d'une plaque à 96 puits où différentes régions d'une seule tranche de tissu ou d'une biopsie peuvent être exposées à plusieurs conditions différentes à la fois. Cela a le potentiel de simplifier la procédure par l'utilisation d'une seule pompe pour la perfusion, mais il reste à démontrer que les interactions croisées de cellules de différentes régions traitées n'ont pas d'effet significatif sur la réponse du tissu.

Une approche différente a été adoptée dans le cadre de ce projet de maîtrise. D'abord, une méthode de découpe du tissu cancéreux en de nombreux échantillons sous-millimétriques

individuels, que nous avons nommés tumeurs micro-disséquées (TMD) et *micro-dissected tumors (MDTs)* en anglais, a été développée. Une plateforme microfluidique simple a été conçue au sein de laquelle les TMD peuvent être piégées par sédimentation et incubées sans perfusion pendant une période allant jusqu'à au moins huit jours. La non-nécessité de perfuser, rendue possible grâce à la petite taille des échantillons, simplifie grandement l'utilisation de ces systèmes qui peuvent être conservés dans un incubateur à cellules normalement trouvé dans tous les laboratoires de biologie cellulaire. Le dispositif d'incubation reproduisant les dimensions et certaines fonctions de la vasculature des tissus permet de contrôler précisément la position des TMD et le milieu les entourant ainsi que d'employer de petits volumes de réactifs coûteux. La capacité de couper le tissu en de nombreux fragments devrait permettre d'effectuer plusieurs tests – en parallèle et sans interaction croisée entre les différentes conditions – sur le volume limité de tissu tumoral primaire typiquement obtenu des patients (*Figure 1.1*).

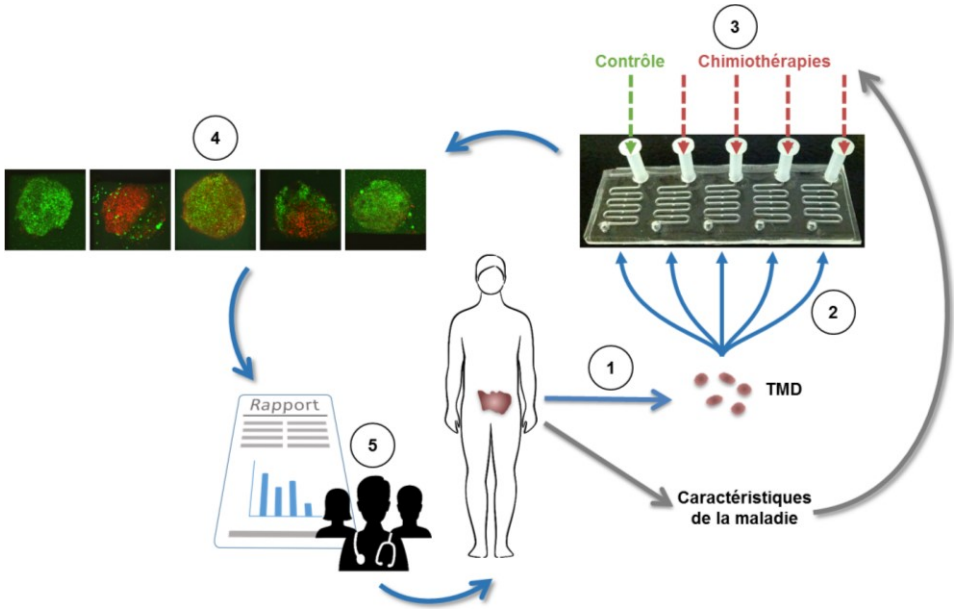


Figure 1.1: Diagramme de l'approche proposée pour orienter le choix de traitement anti-cancer en médecine personnalisée. 1) Le tissu tumoral est extrait du patient et coupé en tumeurs micro-disséquées (TMD). 2) Les TMD sont piégées et cultivées dans un système microfluidique. 3) Les chimiothérapies à tester sont appliquées dans des canaux indépendants en gardant un contrôle non traité. 4) Après une période d'incubation avec les chimiothérapies, les TMD sont analysées pour identifier le traitement le plus efficace. 5) Selon les résultats de la procédure, l'équipe médicale adopte une stratégie de traitement adaptée au patient.

Objectifs de recherche

L'objectif principal de ce projet de recherche est de proposer une nouvelle méthode de culture d'échantillons primaires de tissu tumoral pouvant servir à prédire la réponse de patients à différents traitements, dont la chimiothérapie. Cet objectif principal peut être traduit en cinq sous-objectifs énumérés ci-dessous.

Objectif 1 : Développer une méthode de découpe des tumeurs à des tailles sous-millimétriques.

Objectif 2 : Concevoir une plateforme microfluidique pouvant piéger des TMD et les exposer à différentes conditions de culture.

Objectif 3 : Calculer l'effet de la taille du tissu sur la formation de zones dépourvues d'oxygène dans un modèle simplifié de consommation d'oxygène.

Objectif 4 : Évaluer la viabilité des TMD formées à partir de différents types de tumeurs de souris sur une période de huit jours.

Objectif 5 : Effectuer des tests préliminaires de réponse aux chimiothérapies avec du tissu extrait de patients atteints du cancer.

Organisation générale du mémoire

Le mémoire est organisé en six chapitres, incluant celui-ci dans lequel une revue de la littérature est faite pour positionner le projet dans le contexte actuel de la recherche et préciser les domaines d'application possibles de l'approche proposée. Les avantages et inconvénients des différentes méthodes de culture de cellules cancéreuses sont décrits dans le contexte de la médecine personnalisée en mettant l'accent sur l'importance de la tridimensionnalité pour mieux représenter la réalité des tumeurs solides. Des exemples de systèmes microfluidiques utilisés pour l'étude du cancer montrent comment l'approche proposée se distingue de l'état actuel des connaissances dans le domaine du génie tissulaire sur puce. Enfin, les objectifs du projet sont exposés à la fin de ce premier chapitre.

Le Chapitre 2 présente les aspects théoriques ainsi que les détails expérimentaux des différentes méthodes utilisées pour répondre aux objectifs de recherche. C'est dans ce chapitre que sont décrits en détails la méthode de découpe de micro-fragments de tissus ainsi que le design final

retenu de la plateforme microfluidique. Les principales méthodes d'analyse de la viabilité des TMD étudiées dans ce projet sont aussi présentées.

Le Chapitre 3, au cœur du mémoire, présente les résultats principaux concernant la culture sur puce de TMD. La reproductibilité de la méthode de découpe des tumeurs y est d'abord présentée. Ensuite, le mécanisme de piégeage des TMD est décrit, incluant le calcul des contraintes maximales de cisaillement s'appliquant sur les échantillons à l'intérieur du système et l'évaluation des conditions assurant la stabilité des TMD dans les puits microfludiques. Suivent les calculs de la distribution d'oxygène à l'intérieur et autour d'un morceau sphérique de tumeur, permettant de trouver une approximation de rayon critique du tissu tumoral au-dessus duquel les cellules au centre de l'échantillon risquent de manquer d'oxygène. Le chapitre se poursuit avec une étude de la viabilité, au cours d'une période de huit jours, des TMD produites à partir de quatre types de xénogreffes de souris de cancers de la prostate et de l'ovaire. Enfin, une étude préliminaire effectuée sur le tissu tumoral extrait d'une patiente atteinte du cancer de l'ovaire est montrée.

Le Chapitre 4 décrit le développement des techniques de piégeage et d'analyse d'images en fluorescence. Le processus itératif ayant mené au design final de la plateforme microfluidique est d'abord détaillé. Ensuite, l'algorithme de segmentation des images fluorescentes ainsi que ses limites sont décrits.

Une discussion critique de tous les résultats est réalisée au Chapitre 5. En particulier, une comparaison est faite des multiples techniques de mesure de viabilité explorées. Les limites des techniques développées sont détaillées et des pistes d'amélioration sont proposées.

Au Chapitre 6, le mémoire se conclut par un bref résumé des principaux résultats. Les impacts sociaux-économiques potentiels du projet sont finalement explorés.

L'Annexe A présente les principaux résultats générés dans le cadre d'un stage de trois mois à l'Université de Groningue, dans le laboratoire de Dre Sabeth Verpoorte aux Pays-Bas. Ce stage a été effectué grâce au supplément Michael-Smith offert à certains étudiants détenteurs de la bourse Alexander Graham-Bell du CRSNG. La procédure de coupe et d'incubation dans les plateformes microfluidiques a été adaptée à du tissu de foie de rat, puis la viabilité et l'état métabolique du tissu ont été étudiés à l'aide de plusieurs techniques qui pourraient aussi s'avérer utiles pour l'étude du cancer.

Contributions détaillées

Le projet multidisciplinaire présenté dans ce mémoire a nécessité l'exécution de nombreuses étapes qui n'auraient pas pu être réalisées par une seule personne. De par la nature fragile des échantillons biologiques, ceux-ci devaient être traités et utilisés rapidement. Pour maximiser le nombre d'analyses faites à partir d'un seul morceau de tumeur, la procédure se devait d'être faite en équipe.

L'auteure a bénéficié des installations et expertises des établissements d'attache de son directeur et de sa co-directrice: l'École Polytechnique de Montréal pour la conception, la fabrication et la caractérisation des plateformes microfluidiques ainsi que le CRCHUM pour l'accès aux laboratoires de biologie cellulaire et aux instruments de mesure grâce auxquels le tissu cancéreux a pu être étudié.

Au départ, l'auteure a poursuivi le travail initié par des étudiants au baccalauréat ayant travaillé à sur le projet par le passé. La technique de coupe avait été explorée au CRCHUM en utilisant des échantillons de reins de souris, mais n'avait jamais été appliquée à du tissu cancéreux dans ce laboratoire. La viabilité de ces tissus primaires n'avait pas non plus été mesurée, ni optimisée. L'auteure a travaillé en début de projet à standardiser et à modifier les conditions de coupe pour améliorer la reproductibilité de la taille et de la viabilité des échantillons produits. En particulier, la technique a été grandement améliorée par l'usage d'un poinçon à biopsie pour réduire le diamètre des tranches de tissu et obtenir des échantillons aux dimensions similaires à celles des sphéroïdes matures. L'auteure a aidé à la préparation des injections de cellules pour former les xénogreffes de souris, mais la plupart du temps, cela a été accompli par Jennifer Kendall-Dupont aidée des techniciennes de laboratoire. Les souris ont été suivies par Kim Leclerc Désaulniers et d'autres membres du personnel de l'animalerie du CRCHUM. Au tout début, une fois la xénogreffe récoltée, l'auteure procédait seule à produire les TMD et à les charger dans les microsystèmes. Au fil du temps, Dr Benjamin Péant, Jennifer Kendall-Dupont et Dr Abdul Lateef, entre autres, se sont joints à l'équipe, permettant d'augmenter radicalement le nombre d'échantillons produits et analysés. Quant aux systèmes microfluidiques produits à l'École Polytechnique de Montréal, l'auteure a commencé par employer les dispositifs que d'autres avaient fabriqués par le passé pour ensuite concevoir son propre dispositif qui est encore utilisé à ce jour. La procédure de microscopie confocale a été mise au point à la Plateforme d'imagerie

cellulaire du CRCHUM par l'auteure avec l'aide de Jennifer Kendall-Dupont. Elles se sont partagé la tâche de marquer et d'imager les échantillons. L'auteure a elle-même développé l'algorithme de segmentation des séquences d'images fluorescentes acquises en microscopie confocale. Le Dr Abdul Lateef a mis au point et exécuté la technique de cytométrie en flux. L'auteure a optimisé la technique de détection du biomarqueur de mortalité LDH et en a exploré les limites.

Au cours du stage à l'étranger à l'Université de Groningue, l'auteure a obtenu des échantillons de foie déjà tranchés de l'équipe de Dre Geny Groothuis. Elle a elle-même accompli le reste de la procédure de coupe, de chargement et d'incubation. Pieter Oomen l'a aidée à se familiariser avec certains instruments et procédures alors que Viktoriia Starokozhko lui a montré la technique de détection du marqueur de mortalité LDH. Le système de chromatographie en phase liquide à haute précision a été préparé par Marina de Jager et Jan Visser alors que l'auteure s'est surtout occupée de recueillir les échantillons pour l'analyse. Les tests de microscopie à deux photons ont été accomplis par l'auteure et par Dr Maciej Skolimowski, aidés de Klaas Sjollema du Centre de microscopie du centre médical universitaire de Groningue (UMCG Microscopy and Imaging Center). La microscopie confocale a été faite par l'auteure, aidée de Pieter Oomen et du Dr Maciej Skolimowski.

Tous les résultats présentés dans ce mémoire ont été organisés, mis en figure et interprétés par l'auteure.

CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE

Ce chapitre présente toutes les techniques exécutées en laboratoire ayant permis de répondre aux objectifs de recherche. D'abord est présentée la méthode de coupe du tissu employant un vibratome et un poinçon à biopsie pour générer des TMD. Ensuite, les plateformes microfluidiques utilisées pour incuber les TMD sont décrites et leur mode de fonctionnement est expliqué. Enfin, les principes généraux de fonctionnement des trois différentes techniques d'analyse de la viabilité sont exposés et les détails expérimentaux sont fournis pour chacune d'elles. Les conditions particulières des expériences menées et les détails des techniques d'analyse explorées pendant le stage à Groningue sont plutôt décrits à la section A.1 de l'Annexe A.

2.1 Découpe de tissus à des tailles sous-millimétriques

2.1.1 Prétraitement du tissu

2.1.1.1 Production de xénogreffes de souris

Des xénogreffes de souris ont été utilisées comme modèle de tissu tumoral, afin d'évaluer la méthode de coupe, la méthode de chargement ainsi que la viabilité des échantillons après leur incubation dans les microsystèmes. Quatre différentes lignées de cellules cancéreuses humaines ont été utilisées pour former les xénogreffes : deux lignées dérivées de tumeurs de cancer de la prostate (22Rv1 et PC3, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, É.-U.) ainsi que deux lignées dérivées d'une tumeur (TOV112D) ou d'une ascite (OV90) de cancer de l'ovaire, provenant du laboratoire de la Dre Mes-Masson [48]. Pour former les xénogreffes, les suspensions cellulaires obtenues après l'amplification des cellules dans des cultures en monocouche sont mélangées à volume égal avec du Matrigel® liquide (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, É.-U.) avant d'être injectées dans le flanc de souris immunodéficientes (Charles River Development, Burlington, MA, É.-U.) mâles pour les cellules de prostate ou femelles pour celles d'ovaire. Des tumeurs solides se forment et sont récoltées après une période de croissance variant de 21 à 70 jours dépendamment de la lignée cellulaire injectée.

2.1.1.2 Réception de tissu tumoral humain

À travers une étroite collaboration avec des chirurgiens du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), notamment Dre Diane Provencher de l'unité de gynécologie oncologique, et grâce au consentement des patientes, certains spécimens de tissu tumoral humain de cancer de l'ovaire ont été obtenus à la suite de chirurgies de cytoréduction. Les spécimens ont été transportés sur la glace jusqu'au laboratoire où la procédure de coupe a été entamée aussitôt que possible.

2.1.2 Procédure de découpe du tissu cancéreux

Les tumeurs ont dû être coupées à des tailles sous-millimétriques afin d'être insérées dans les microsystèmes. Pour produire de tels échantillons, nommés « tumeurs micro-disséquées » (TMD), la xénogreffe de souris ou le tissu tumoral humain est d'abord coupé en minces fragments (~1 mm de large par 5 mm de long), tel que montré à la *Figure 2.1A*. Ceux-ci sont ensuite coulés dans de l'agarose à bas point de fusion (en anglais : *low melting point (LMP) agarose*, 3,7% masse/volume, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.) supplémentée avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, É.-U.) et gardée liquide entre 40 et 45°C (*Figure 2.1B*). Les échantillons sont ensuite mis sur la glace pendant au moins 30 minutes pour permettre à l'agarose de se solidifier et de former une structure de support autour du fragment de tissu (*Figure 2.1C*). Plusieurs blocs d'agarose contenant du tissu sont repositionnés à la verticale, collés sur le support d'un vibratome traditionnel (The Vibratome Company Inc., St. Louis, MO, É.-U.) et placés dans une solution saline équilibrée de Hank (en anglais : *Hank's balanced salt solution (HBSS)*, #311-516-CL, Wisent Inc., St-Bruno-de-Montarville, QC, Canada) gardée à 15°C et supplémentée avec 10% de FBS, 55 mg/L de gentamicine (idem) et 600 µg/L d'amphotéricine B (idem). Des minces tranches de 300 µm d'épais sont ensuite produites avec un vibratome (*Figure 2.1D* et *Figure 2.1E*). Les tranches de tissu entouré d'agarose ainsi obtenues sont gardées dans la même solution jusqu'à ce que les TMD soient générées en utilisant un poinçon à biopsie de 500 µm de diamètre (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, É.-U.), tel que montré à la *Figure 2.1F*. Ces TMD de forme discoïdale sont alors prêtes à être chargées dans les systèmes (*Figure 2.1G*).

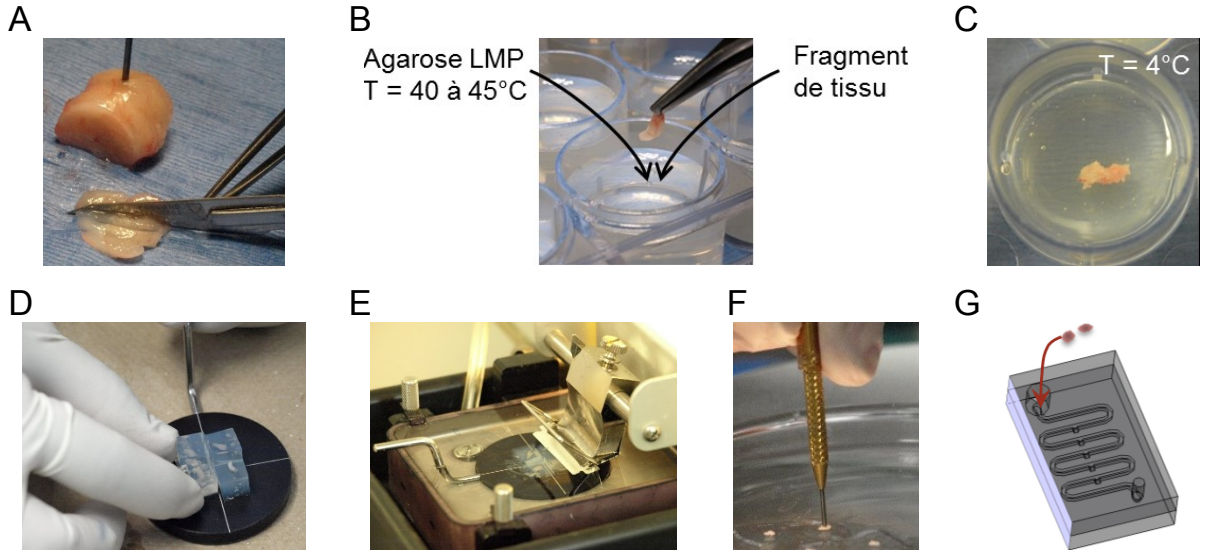


Figure 2.1: Procédure de découpe du tissu cancéreux pour l'insertion dans les systèmes microfluidiques. A) Coupe au scalpel d'une xénogreffe de souris en minces fragments. B) Coulage d'un fragment de tissu dans de l'agarose LMP gardée liquide entre 40 et 45°C. C) Création d'une structure de support autour du tissu par la solidification de l'agarose à 4°C. D) Positionnement à la verticale des fragments de tissu et collage des blocs d'agarose sur le support du vibratome. E) Production de minces tranches de tissu au vibratome. F) Coupe finale d'une tranche de tissu à l'aide d'un poinçon à biopsie de 500 µm de diamètre pour produire une TMD. G) Insertion de TMD dans l'entrée d'un système microfluidique.

2.2 Plateformes microfluidiques à piégeage par sédimentation

2.2.1 Conception

La configuration de la plateforme microfluidique conçue est montrée à la *Figure 2.2A*. La plateforme est composée de deux niveaux fluidiques : le niveau supérieur montré en contours noirs où les TMD et le milieu circulent, et le niveau inférieur montré en rouge où les TMD sédimentent. La vue de côté d'une TMD circulant dans un canal jusqu'à son piège est schématisée à la *Figure 2.2B*. Chaque plateforme comporte cinq canaux indépendants sur une surface de seulement 2,5 cm par 7,5 cm équivalente à celle d'une lame de microscope standard. Chaque canal (ou système) comporte cinq pièges, ce qui permet à une plateforme de contenir jusqu'à 25 TMD et de tester jusqu'à cinq conditions de traitement différentes. La longueur (78 mm) a été choisie pour que les échantillons puissent être contrôlés en utilisant une micropipette de 20 µL. Les cinq pièges sont

également répartis tout le long du canal, ce qui maximise la quantité de nutriments auxquels les TMD ont accès dans des conditions sans perfusion. Chaque canal est disposé en serpentin afin qu'il puisse être observé en entier sous un stéréomicroscope de faible magnification. Les canaux ont une section transverse carrée de 600 µm par 600 µm alors que les pièges à fond carré ont des dimensions de 600 µm de large par 500 µm de profond. Chaque canal a donc un volume total de 29 µL. Ces dimensions peuvent accueillir des TMD de forme discoïdale d'environ 380 µm de diamètre par 300 µm de haut.

Tel que montré à la *Figure 2.2C*, l'entrée de chaque système comporte un microréservoir qui facilite le chargement des TMD dans le système. Le bas du microréservoir est au même niveau que le canal microfluidique avec lequel il connecte, soit légèrement plus enfoncé que le reste de l'entrée.

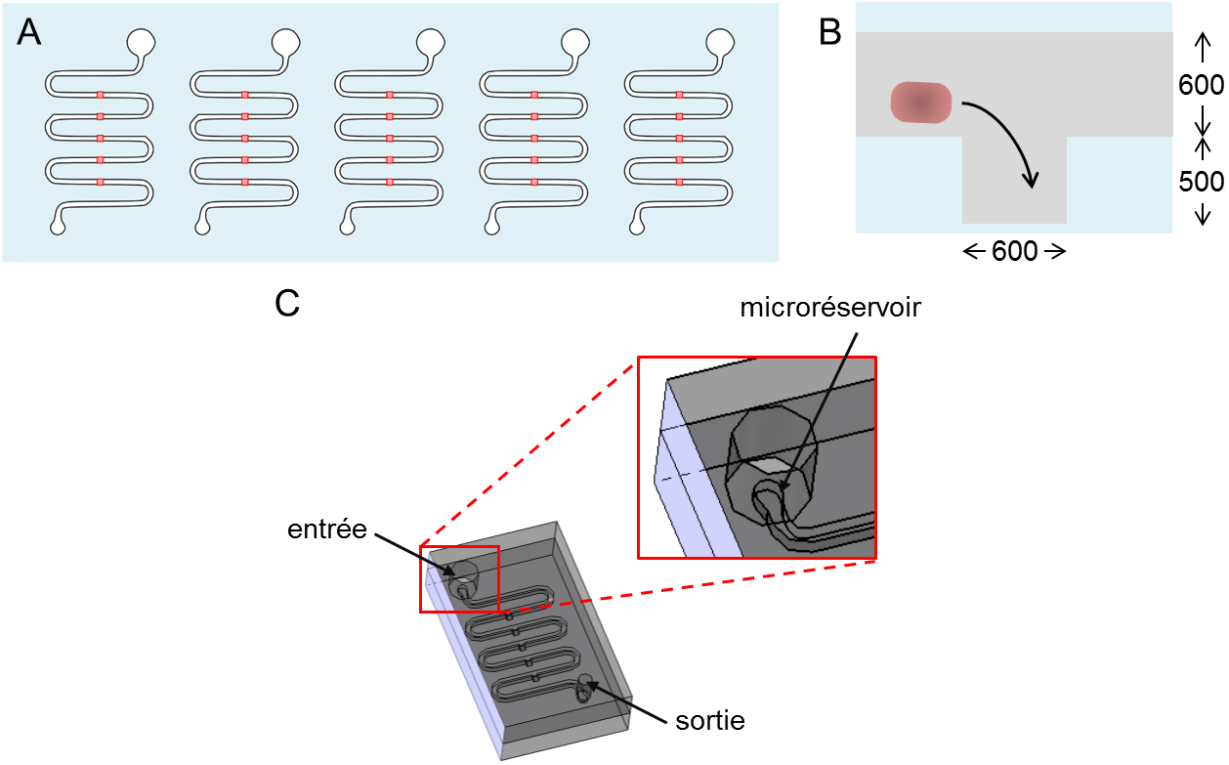


Figure 2.2: Conception de la plateforme microfluidique. A) Vue de haut de la plateforme comportant cinq canaux indépendants (contours noirs), chacun contenant cinq pièges microfluidiques (rouge). B) Vue de côté d'une TMD circulant dans le canal jusqu'à un piège, incluant les dimensions principales en micromètres. C) Vue 3D d'un système avec une entrée, une sortie, et un microréservoir situé au fond de l'entrée.

2.2.2 Fabrication

Deux moules ont été utilisés pour fabriquer les plateformes : le premier comporte les motifs pour former les deux niveaux fluidiques, soit les canaux et les pièges (*Figure 2.3A*), et le deuxième comporte des piliers de 3 mm et de 2 mm de diamètre pour produire des trous dans la couche moulée, servant d'entrées et de sorties aux canaux (*Figure 2.3B*). Ces moules en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) sont micro-usinés en utilisant des fraises de surfaçage de 1 mm et de 3,57 mm de diamètre respectivement, opérées par une machine-outil à commande numérique (CNC, Laboratoire de nanorobotique du professeur Sylvain Martel).

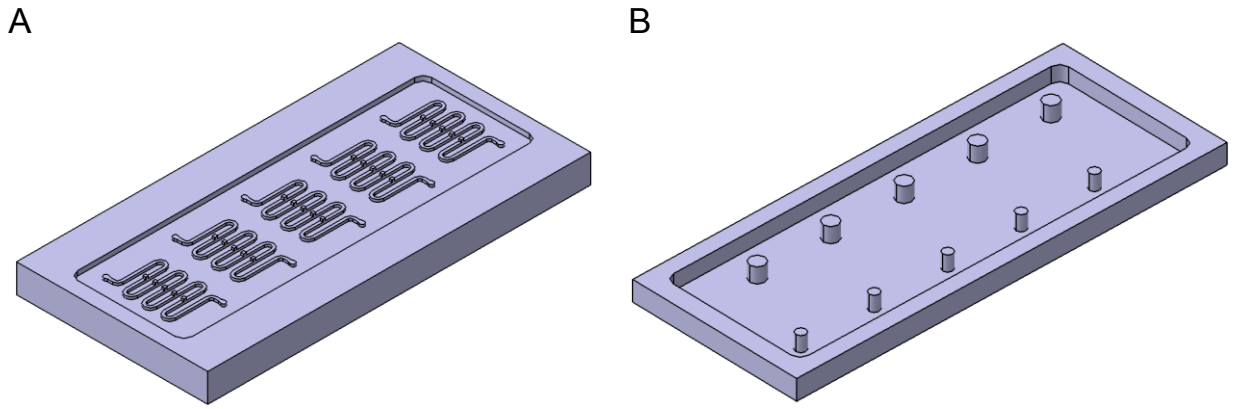


Figure 2.3: Moules utilisés pour fabriquer les plateformes microfluidiques. A) Modèle du premier moule en PMMA avec des motifs pour former les canaux et les pièges de la couche de PDMS du bas de la plateforme. B) Modèle du deuxième moule en PMMA avec des piliers pour former les trous d'entrée et de sortie de la couche de PDMS du haut de la plateforme.

Du PDMS liquide (Sylgard® 184 silicone elastomer kit, Dow Corning, Midland, MI, É.-U.), préparé à un ratio massique de monomères de base pour agent durcissant de 10:1, est versé dans chaque moule, dégazé, puis cuit à 80°C pendant 1,5 heures. Une masse précise de PDMS, soit 3,3 g, est utilisée dans le premier moule pour assurer une épaisseur reproductible du bas de la plateforme. Après démoulage, les deux couches de PDMS sont activées en utilisant un générateur de plasma atmosphérique (« Dyne-a-mite », Enercon, Menomonee Falls, WI, É.-U.), alignées, puis collées ensemble. Des cylindres creux en nylon (#91145A138, McMaster-Carr, Elmhurst, IL, É.-U.) sont finalement insérés dans les entrées des systèmes pour former des réservoirs plus hauts. Ceux-ci facilitent la procédure de changement de milieu, empêchent les débordements et peuvent contenir un petit volume de milieu supplémentaire (généralement 20 à 30 µL) pendant l'incubation

pour éviter qu'une éventuelle évaporation ne ruine l'expérience en faisant pénétrer de l'air dans les systèmes. La *Figure 2.4* montre comment les différentes parties de la plateforme sont assemblées entre elles.

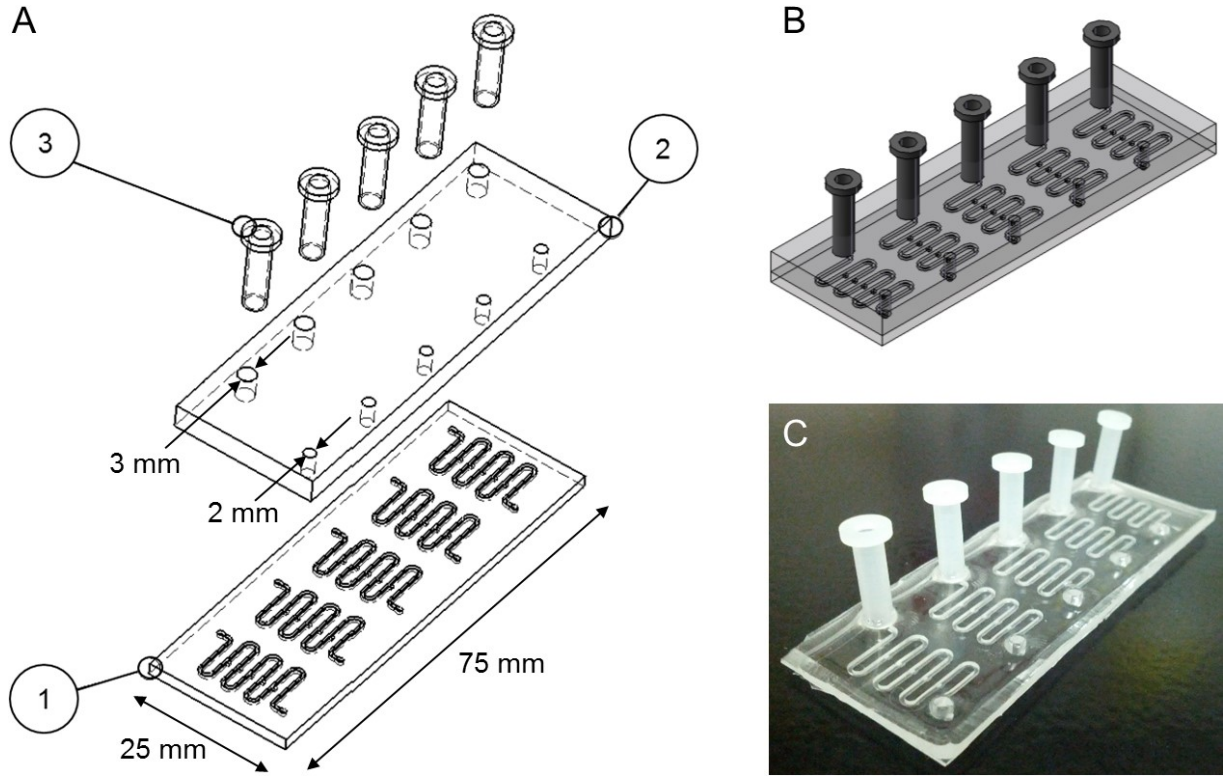


Figure 2.4: Assemblage de la plateforme microfluidique. A) Vue éclatée des parties du système : 1- la couche de PDMS inférieure comprenant les canaux et les pièges, 2- la couche de PDMS supérieure comprenant les cinq trous d'entrée et les cinq trous de sortie, et 3- les cinq réservoirs d'entrée. B) Schéma d'une plateforme microfluidique complète assemblée. C) Photographie d'une plateforme fabriquée et assemblée.

2.2.3 Mode d'opération

Une fois fabriqués, les microsystèmes sont traités pour recevoir les TMD. D'abord, l'air est retiré des systèmes en utilisant de l'éthanol pur (100%), solvant pour lequel le PDMS a une mouillabilité élevée. Sans vider les canaux, l'éthanol pur est ensuite remplacé par un mélange éthanol-eau (70%/30%) pendant 10 minutes afin de stériliser les systèmes.

Avant de recevoir le tissu cancéreux, les surfaces des canaux sont traitées avec une solution stérile de 10 mg/mL de copolymère tribloc Pluronic® F-108 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

É.-U.), laissée pour incuber dans une chambre humide à 37°C pendant au moins une heure ou jusqu'au lendemain. Les molécules de Pluronic® F-108 sont composées de deux queues hydrophiles et d'une tête hydrophobe qui se lie au PDMS à travers des interactions hydrophobes. Ce traitement vise à prévenir l'adhésion de cellules et l'adsorption de protéines à la surface du PDMS grâce à l'encombrement stérique provoqué par les queues des molécules de Pluronic® F-108 [49]. En cas de formation de bulles dans les systèmes, les étapes de traitement avec l'éthanol sont répétées. Les systèmes sont finalement rincés et remplis de HBSS, puis sont placés dans une chambre humide à l'intérieur d'un incubateur à cellules, prêts à recevoir des TMD.

Une fois les TMD produites, les plateformes sont retirées de l'incubateur et placées sous un stéréomicroscope pour procéder à l'étape de chargement du tissu. Pour éviter la perte d'échantillons dans l'entrée, le cylindre creux peut être retiré en laissant du milieu dans l'entrée. Cinq TMD sont collectées en utilisant une micropipette de 20 µL, puis sont déposées dans le microréservoir au fond de l'entrée (*Figure 2.2C*). En aspirant à la sortie du canal en utilisant la même micropipette, un débit est induit et les TMD sont emportées à l'intérieur du canal. En étant positionnées dans le microréservoir, les TMD sont soumises à un débit plus élevé que si elles étaient placées ailleurs dans l'entrée. Soit en aspirant ou soit en expulsant du liquide à la sortie du système, les TMD sont conduites jusqu'aux pièges. Le débit est arrêté pendant une à deux secondes lorsqu'une TMD est positionnée au-dessus d'un piège vide afin qu'elle puisse y sédimenter. Après le chargement des cinq TMD dans un système, le cylindre d'entrée est réinséré, puis le HBSS est remplacé avec du milieu de culture : soit du milieu OSE (#316-031-CL, Wisent Inc., St-Bruno, Canada) pour les TMD de cancer de l'ovaire ou soit du milieu RPMI 1640 (#350-045-CL, Wisent Inc., St-Bruno, Canada) pour les TMD de cancer de la prostate. Les milieux OSE et RPMI 1640 sont tous deux supplémentés avec 10% de FBS, 55 µg/mL de gentamicine et 0,6 µg/mL d'amphotéricine B, et préchauffés à 37°C. Avec environ 20 µL de milieu dans les entrées, les plateformes chargées sont replacées dans une chambre humide, à l'intérieur de l'incubateur à cellules (37°C, 95% air ambiant, 5% CO_2).

Pour procéder au changement de milieu, le réservoir d'entrée est vidé, puis le milieu de remplacement est ajouté dans l'entrée. Le milieu restant dans les canaux est aspiré de la sortie à l'aide d'une pipette de 20 µL. Ce faisant, le nouveau milieu pénètre graduellement dans le système. Tel que montré à la *Figure 2.5*, un volume de 60 µL est retiré de la sortie pour assurer que la totalité du système (volume total de 29 µL) soit rempli de nouveau milieu.

Le milieu de culture est changé à plusieurs reprises au cours d'une expérience, généralement après un, trois, six et huit jours d'incubation. Dans certaines expériences, le milieu contient en plus des agents chimiques dont l'effet sur la viabilité des échantillons doit être évalué. Dans certains cas, les fractions de milieu ainsi collectées à différents points dans le temps sont conservées pour l'analyse de molécules sécrétées par les TMD pendant la période d'incubation ou pour conserver les cellules mortes qui auraient pu se détacher des TMD et sortir des pièges.

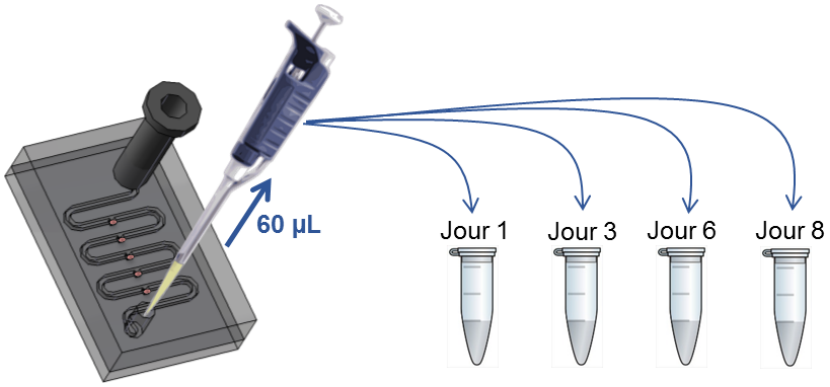


Figure 2.5: Aperçu de la procédure pour changer le milieu et en collecter des fractions. Le schéma n'est pas à l'échelle.

2.3 Analyse de viabilité des TMD

Trois techniques ont été employées avec succès pour mesurer la survie des TMD sur une période de huit jours : la microscopie confocale sur des TMD marquées pour différencier les cellules viables des cellules mortes, la cytométrie en flux pour catégoriser les cellules des TMD en trois groupes selon leur stade de mortalité (viables, en apoptose précoce, ou en apoptose tardive ou mortes), et la détection du marqueur de mortalité (lactate déshydrogénase, LDH) dans les fractions de milieu retirées des systèmes.

2.3.1 Microscopie confocale

La microscopie confocale a été employée pour évaluer la distribution spatiale de la viabilité à différentes profondeurs au sein du tissu 3D. Sachant que la session d'imagerie pourrait affecter la viabilité des TMD à cause de l'exposition aux conditions ambiantes hors de l'incubateur et de l'effet des lasers sur le tissu, chaque TMD n'a été imagée qu'une seule fois, sauf pour les TMD de tissu humain à la section 3.4 disponibles en plus petites quantités. De multiples systèmes différents

ont donc été imagés à différents temps d'analyse pour refléter l'évolution de la survie des échantillons. Pour discriminer les cellules viables des cellules mortes, deux fluorophores de viabilité peuvent être employés, tel que détaillé à la section 2.3.1.1.

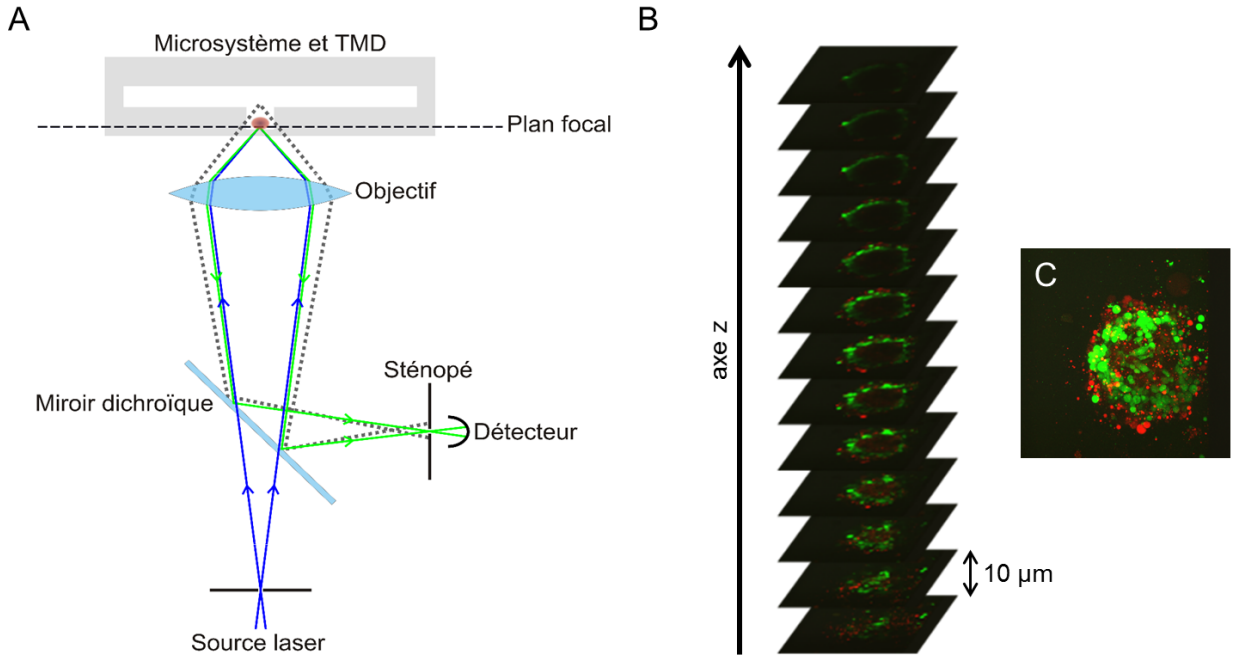


Figure 2.6: Principe de sectionnement optique en microscopie confocale. A) Schéma simplifié d'un microscope confocal inversé qui image un échantillon piégé dans un système microfluidique (vue de côté), montrant le trajet de la lumière à travers ses principales composantes optiques. Schéma adapté de « Diagram of confocal principle » par Danh licensé sous CC BY-SA 3.0 [50]. B) Tranches optiques d'une TMD résultant de l'acquisition au microscope confocal en modifiant la position du plan focal dans l'échantillon. C) Représentation 2D (nommée projection maximale) des tranches optiques montrées en B dans laquelle les zones les plus intenses du spécimen sur toute sa profondeur sont visualisées.

Ce type de microscopie rend possible le sectionnement optique des échantillons grâce au sténopé placé devant les détecteurs qui élimine toute la lumière fluorescente qui ne provient pas du plan focal. Tel que montré à la *Figure 2.6A*, la lumière de la source (lignes bleues) est focalisée par l'objectif et traverse la mince couche de PDMS formant le bas de la plateforme pour exciter les fluorophores de l'échantillon tandis que la lumière fluorescente émise (lignes vertes) repasse par l'objectif, est réfléchie par le miroir dichroïque et passe par le sténopé pour atteindre le détecteur. La lumière fluorescente ne provenant pas du plan focal (lignes grises pointillées) est bloquée au

sténopé et ne parvient pas au détecteur. Cependant, la majorité de la fluorescence diffusée par le tissu n'est pas captée par le détecteur, même si elle provenait originalement du plan focal, ce qui limite la profondeur de pénétration de ce type de microscopie.

2.3.1.1 Marquage des échantillons avec des fluorophores de viabilité et de mortalité

Pour évaluer la viabilité des TMD, les échantillons sont marqués en utilisant deux fluorophores : le CellTracker® Green diacétate de 5-chloromethylfluorescéine (CTG CMFDA, #C2925, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.) et l'iodure de propidium (en anglais : *propidium iodide (PI)*, #P4864, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, É.-U.). Tel que schématisé à la *Figure 2.7*, le CTG est une molécule qui devient fluorescente une fois les groupements acétate clivés par des enzymes, plus particulièrement les estérases, actives à l'intérieur des cellules viables [51]. La membrane cellulaire est imperméable à la forme clivée de la molécule, et donc le signal fluorescent est retenu à l'intérieur de la cellule. Le PI, quant à lui, peut seulement pénétrer à l'intérieur des cellules en apoptose tardive ou des cellules mortes, une fois la membrane cellulaire endommagée. Ce marqueur s'intercale entre les bases des acides nucléiques, ce qui provoque une intensification de son signal fluorescent de 20 à 30 fois [52]. En combinant les deux marqueurs, il est possible de classer les cellules en deux groupes : les cellules viables dont le cytoplasme est marqué par le CTG et les cellules mortes dont le noyau et l'ARN sont marqués par le PI.

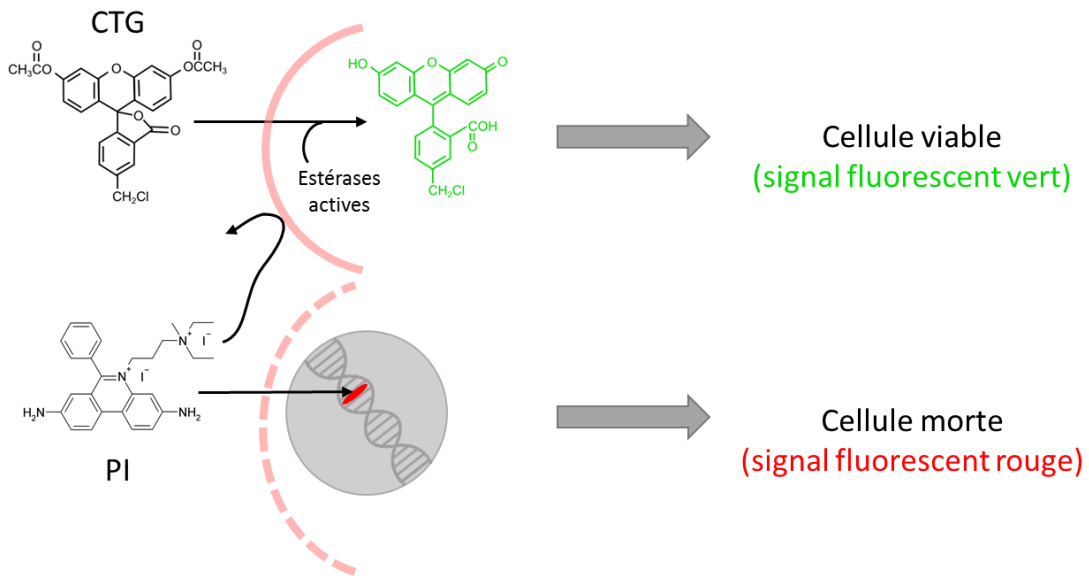


Figure 2.7: Mécanismes d'action des deux fluorophores utilisés pour distinguer les cellules viables des cellules mortes.

La 7-aminoactinomycine D (7-AAD) est une molécule qui marque aussi sélectivement l'ADN des cellules mortes. Son mécanisme d'action est très similaire à celui du PI. Cet agent a été utilisé dans quelques expériences en remplacement du PI.

Les échantillons sont marqués séquentiellement avec des solutions de HBSS contenant soit du CTG (5 µM), soit une combinaison de CTG et de PI (1,5 µM). Ces solutions sont simplement ajoutées aux systèmes en suivant le protocole de changement de milieu décrit plus haut (section 2.2.3). Les TMD incubent ainsi avec le CTG pendant au moins 45 minutes, puis 30 minutes additionnelles avec les deux marqueurs. Ensuite, les systèmes sont rincés deux fois avec du HBSS afin de minimiser le signal de fond pouvant provenir de la fluorescence moins intense des molécules de PI non liées à l'ADN. Les molécules de CTG en excès et non clivées par les estérases des cellules viables ne devraient pas fluorescer, mais elles sont tout de même évacuées des systèmes lors des rinçages.

2.3.1.2 Acquisition d'images au centre de microscopie du CRCHUM

Toutes les images de TMD ont été acquises en utilisant un microscope confocal inversé de type Leica TCS SP5 II (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) muni d'un objectif 20X (sans liquide d'immersion). Pour minimiser la détection de signal d'autofluorescence des échantillons, des seuils supérieurs sont déterminés pour les paramètres d'acquisition, soient l'intensité du laser et le gain des détecteurs. Ces seuils sont choisis au début de chaque expérience en imageant d'abord des TMD non marquées et en s'assurant que seulement un très faible signal soit détecté. Les TMD marquées, toujours positionnées dans leurs puits, sont ensuite imagées en tranches optiques espacées de 10 µm et ce, directement à travers la mince couche de PDMS formant le bas de la plateforme. Le CTG et le PI sont excités séquentiellement en utilisant des lasers de 488 nm et de 561 nm, et leur signal est collecté aux plages de longueurs d'onde 500-550 nm et 600-700 nm, respectivement (*Figure 2.8*). Les projections maximales, soit la superposition de toutes les tranches optiques d'un même échantillon en une seule image représentant les zones les plus intenses du spécimen sur toute sa profondeur, sont produites pour chaque TMD (*Figure 2.6B* et *Figure 2.6C*).

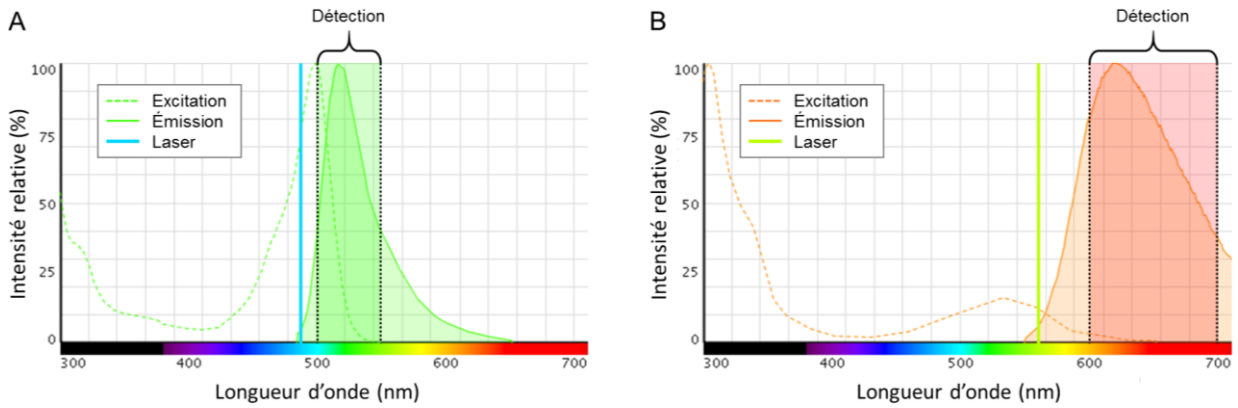


Figure 2.8: Spectres d'excitation et d'émission associés au CTG (A) et au PI (B). Les longueurs d'onde des lasers et les plages de détection employées lors de l'acquisition des deux signaux sont superposées aux graphiques. Graphiques produits à l'aide de l'outil Fluorescence SpectraViewer de Thermo Fisher Scientific [53].

2.3.1.3 Algorithme d'analyse d'images

L'algorithme d'analyse des images de TMD a été réalisé à l'aide de MATLAB (MathWorks®, Natick, MA, É.-U.), un langage de programmation de haut niveau, muni du module « Image Processing Toolbox™ ». Pour quantifier la viabilité, l'algorithme calcule le ratio de l'aire occupée par les cellules viables (marquées avec le CTG) sur l'aire totale occupée par toutes les cellules détectées (marquées avec le CTG ou le PI). Les étapes principales exécutées par l'algorithme pour chacune des séquences d'images sont résumées ci-dessous.

1. Réduire le bruit en appliquant un filtre médian.
2. Égaliser le signal dans les canaux du CTG et du PI en réduisant l'intensité dans les zones au signal élevé et en augmentant l'intensité dans les zones plus sombres.
3. Déterminer les contours des signaux rouge et vert par le calcul du Laplacien des images.
4. Appliquer la méthode de seuillage d'Otsu seulement aux pixels correspondant aux contours trouvés à l'étape 3. Ceci a pour effet d'équilibrer la contribution des pixels du signal de fond avec celle des pixels du signal à segmenter pour la détermination du seuil. La méthode d'Otsu trouve la valeur d'intensité optimale (seuil) qui sépare les pixels en deux classes tout en minimisant la variance intra-classe.

5. Binariser la séquence d'images en utilisant un double seuil pour chacun des deux signaux :
    a. Appliquer un seuil équivalent à 75% du signal de saturation à la séquence obtenue de l'étape 1 afin de détecter tout le signal de saturation.
    b. Appliquer le seuil trouvé à l'étape 4 à la séquence obtenue de l'étape 2 afin de détecter tout le signal plus faible présent.
    c. Unir les régions détectées en a) et en b).
6. Si les signaux segmentés pour le CTG et pour le PI se superposent pour un pixel spécifique, vérifier l'intensité des deux signaux à ce pixel d'intérêt dans l'image originale et assigner une fraction de l'unité d'aire à chacun d'eux suivant la formule suivante :

$$\text{Fraction de l'aire du signal 1} = \frac{\text{intensité du signal 1 au pixel d'intérêt}}{\text{intensité du signal 1} + \text{intensité du signal 2}}$$

7. Calculer la viabilité globale de chaque échantillon en déterminant le ratio de l'aire du signal CTG-positif sur la somme des aires des signaux CTG-positif et PI-positif.

2.3.2 Cytométrie en flux

Cette technique a été mise au point dans le laboratoire de Dre Mes-Masson au CRCHUM par le Dr Abdul Lateef. Toute l'acquisition de données par cette technique a été menée par celui-ci et à quelques occasions, l'auteure de ce mémoire a pu y participer. Les données telles que présentées dans ce mémoire ont été mises en forme et analysées par l'auteure.

La cytométrie en flux est la technique standard employée pour évaluer la viabilité de cellules individuelles. Pour ce faire, une suspension cellulaire doit être incubée avec des fluorophores qui marquent préférentiellement différents stades de mortalité. Ensuite, l'instrument permet de mesurer l'intensité fluorescente de chaque cellule qui passe à l'intérieur de la gaine liquide, devant les lasers (*Figure 2.9A*). Le profil de diffusion de la lumière (diffusion vers l'avant et sur le côté) est enregistré, ce qui permet d'éliminer de l'analyse toutes les particules indésirables, telles que des fragments de cellules, des poussières, ainsi que des doublets de cellules.

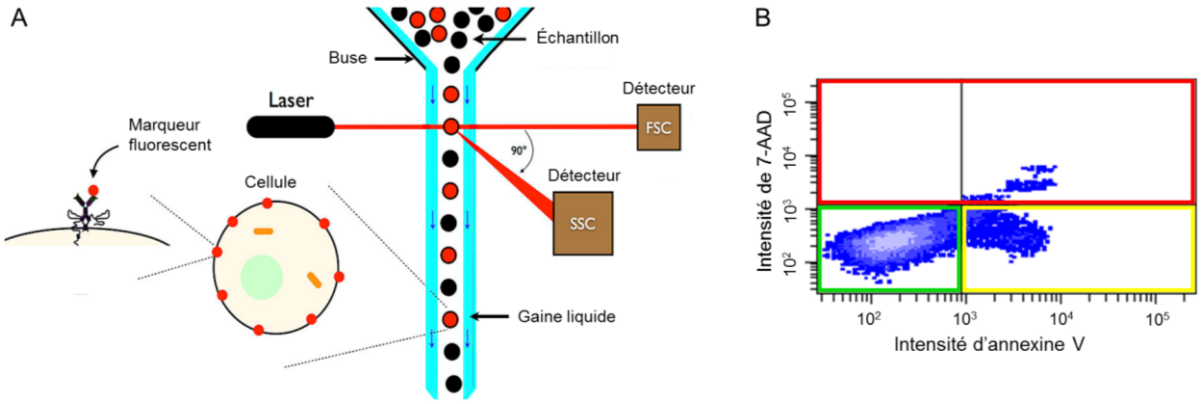


Figure 2.9: Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux. A) Une suspension cellulaire (échantillon) est hydrofocalisée par la buse du système de sorte que les cellules circulent une à une à l'intérieur de la gaine liquide. Lorsqu'une cellule passe au niveau du faisceau laser, la lumière diffusée par la cellule est captée par les détecteurs FSC et SSC alors que la lumière fluorescente émise par une cellule marquée est mesurée par d'autres détecteurs (non illustrés). Schéma adapté de « Fluorescence Assisted Cell Sorting (FACS) showing positive cell selection » par Sari Sabban, licensé sous CC BY-SA 3.0 [54]. B) Exemple d'acquisition de données pour des cellules marquées avec l'Annexine V et la 7-AAD, permettant de les catégoriser en trois groupes (rectangles vert, jaune et rouge) selon l'intensité de la fluorescence mesurée pour chaque fluorophore.

Cette technique a été adaptée à notre procédure et employée pour valider les résultats de microscopie confocale. Les TMD sont marquées à l'intérieur des systèmes microfluidiques en utilisant les marqueurs fluorescents d'apoptose : l'annexine V et la 7-AAD (PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I, #559763, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, É.-U.). Pour extraire les TMD des systèmes, les deux couches de PDMS peuvent être décollées et séparées l'une de l'autre (grâce à notre procédé plasma résultant en une adhésion réversible entre les deux couches de PDMS) et ce, sans affecter la position des TMD dans leurs pièges. Toutes les cinq TMD d'un seul système sont retirées de leurs puits à l'aide d'une micropipette et sont groupées dans le même tube pour l'analyse. Le tissu est ensuite incubé avec de la collagénase IV afin que l'action de l'enzyme aidée par l'action mécanique du pipetage répété désagrège le tissu en cellules individuelles. Celles-ci sont mélangées à toutes les fractions de milieu du même système collectées au cours de l'expérience (*Figure 2.5*). Ceci assure que les cellules qui auraient été extraites des systèmes pendant les changements de milieu (également marquées) soient prises en compte pendant

l'analyse. Les petits fragments de cellules et les doublets sont retirés de l'analyse. Tel que montré à la *Figure 2.9B*, chaque cellule est associée à l'un des trois stades de viabilité selon son marquage fluorescent : en apoptose précoce (marquée par l'annexine V seulement – rectangle jaune), en apoptose tardive ou morte (doublement marquée par la 7-AAD et l'annexine V, ou seulement marquée par la 7-AAD – rectangle rouge), et viable (non marquée – rectangle vert). Certaines TMD sont soumises au même protocole, mais sans l'étape de marquage. Elles sont utilisées, avec les contrôles positifs, pour ajuster le gain des détecteurs et les seuils de détection.

2.3.3 Sécrétion du marqueur de mortalité lactate déshydrogénase (LDH)

Cette procédure a été établie pour mesurer la présence d'un biomarqueur de mortalité cellulaire dans le milieu entourant les TMD. Le biomarqueur choisi est une enzyme cytoplasmique, la LDH, qui s'échappe des cellules mortes et peut être mesurée dans le milieu collecté à la sortie d'un système. Cette technique a été employée par d'autres groupes étudiant des échantillons de tissu *ex vivo* [45], [55] puisqu'elle permet un suivi de la mort cellulaire dans le temps. Nous présenterons ici des résultats permettant de comparer cette méthode aux deux introduites précédemment (microscopie confocale et cytométrie en flux).

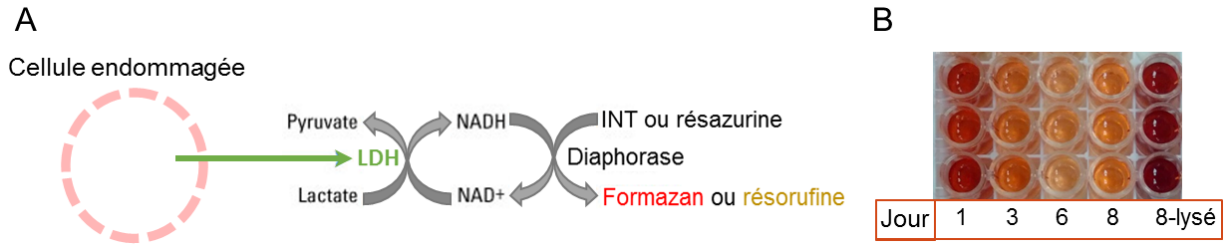


Figure 2.10: Principe de fonctionnement du test de détection du marqueur de mortalité LDH. A) La LDH est relâchée des cellules mortes dans le milieu. Après l'ajout de lactate à la solution, la LDH provoque la transformation du sel de tétrazolium (INT) ou la résazurine en une forme détectable par mesure d'absorbance (formazan) [56] ou de fluorescence (résorufine) [57]. B) Photographie d'une portion de plaque à 96 puits où des fractions de milieu ont été incubées avec le mélange de réaction du kit de détection de LDH par absorbance, montrant différentes absorbances des solutions associées à des quantités différentes de LDH relâchées dans le milieu par les TMD en fonction du jour de prélèvement dans le système microfluidique.

2.3.3.1 Particularités du test LDH effectué au CRCHUM

Tel qu'illustré à la *Figure 2.5*, des fractions de milieu (60 µL) sont collectées aux différents temps d'analyse en changeant le milieu d'un même système pour suivre l'évolution de la sécrétion du marqueur de mortalité dans le temps. Tous les échantillons de milieu ainsi récoltés sont conservés à 4°C jusqu'au dernier jour d'analyse. Ce jour-là, les cinq TMD du système suivi sont collectées et digérées – en suivant la même procédure (décrite à la section 2.3.2) que pour les échantillons passés en cytométrie – puis sont lysées pour libérer toute la LDH restante dans les cellules jusque-là viables de l'échantillon.

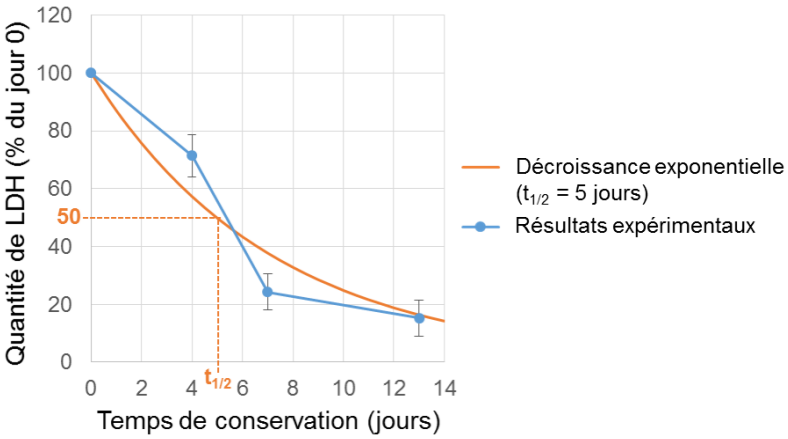


Figure 2.11: Justification du temps de demi-vie utilisé pour corriger les mesures de LDH. Courbe bleue : moyenne de la quantité de LDH mesurée pour quatre différents échantillons de cellules lysées en fonction du temps de conservation à 4°C; courbe orange : courbe théorique d'une décroissance exponentielle pour un temps de demi-vie de cinq jours. Les barres d'erreur représentent ± l'écart-type sur quatre mesures de LDH d'échantillons différents.

La LDH présente dans chaque fraction de milieu et dans le tissu lysé est quantifiée à l'aide d'un kit de détection en absorbance (Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH), #04744926001, Roche Diagnostics, Basel, Suisse) en utilisant 50 µL d'échantillon, 100 µL de mélange de réaction et 50 µL de solution d'arrêt. Pendant la période d'incubation d'environ 30 minutes à 37°C avec le mélange de réaction, la LDH présente dans la solution induit la conversion d'une molécule incolore, le sel de tétrazolium (INT), en une composante rouge, le sel de formazan, détectable à l'aide d'un lecteur d'absorbance à 490 nm (*Figure 2.10A*) [56]. Chaque mesure est associée à une quantité de LDH grâce à une courbe standard. En général, les échantillons lysés contiennent beaucoup plus de LDH que les fractions de milieu. Dans ces circonstances, ils sont dilués afin que

l'absorbance mesurée demeure dans la portion linéaire de la courbe standard. Le temps de demi-vie de la LDH conservée à 4°C est estimé à cinq jours (*Figure 2.11*). Pour tenir compte de la dégradation (supposée exponentielle) de l'enzyme, les mesures d'absorbance sont divisées par le facteur de correction $0{,}87^n$, où n est le nombre de jours s'étant écoulés entre l'extraction du milieu du système et le jour de la quantification de la LDH. Chaque mesure est de plus normalisée par rapport à la somme des quantités de LDH mesurées dans tous les échantillons d'un même système. Puisque la quantité de LDH relâchée est proportionnelle à la mortalité cellulaire, les données sont présentées comme un taux de mortalité (pourcentage de mort par jour).

CHAPITRE 3 CULTURE SUR PUCE DE TUMEURS MICRO-DISSÉQUÉES

Ce chapitre met en lumière tous les résultats générés pour répondre aux objectifs de ce projet de maîtrise. D'abord, la distribution de la taille des TMD est montrée pour différents types de xénogreffe. Ensuite, la plateforme microfluidique est caractérisée : le mécanisme de piégeage est décrit en détails, la contrainte de cisaillement maximale exercée sur le tissu est calculée, les conditions de stabilité des TMD dans leur piège sont discutées et le transport de nutriments dans le système microfluidique est étudié à l'aide d'un modèle simple de diffusion et de consommation d'oxygène. De plus, l'analyse de viabilité des quatre différents types de TMD est faite par trois techniques d'analyse complémentaires. Enfin sont montrés les résultats d'un test préliminaire de réponse du tissu cancéreux primaire d'une patiente à un traitement de chimiothérapie effectué au sein de la plateforme.

3.1 Découpe de tumeurs à des tailles sous-millimétriques

Toute la procédure impliquant le sectionnement, le chargement dans les plateformes microfluidiques et l'incubation sur plusieurs jours a d'abord été optimisée en utilisant quatre types de xénogreffes de souris formées de cellules de cancers de la prostate (22Rv1 et PC3) et de l'ovaire (OV90 et TOV112D). Comparé au modèle de sphéroïdes utilisé précédemment [30], ce modèle de tumeur ajoute deux niveaux de complexité qui faciliteront ensuite la transition vers l'utilisation de tissu humain de patients. Premièrement, les xénogreffes doivent être extraites de la souris et être maintenues en vie dans un environnement différent *in vitro*, au sein des plateformes microfluidiques. Deuxièmement, les tumeurs de souris doivent être sectionnées en de multiples échantillons sous-millimétriques pouvant être insérés dans plusieurs systèmes microfluidiques.

Des TMD de tailles reproductibles ont été obtenues en découpant des minces tranches de tissu d'environ 300 µm d'épais à l'aide d'un vibratome, puis en coupant davantage les tranches en petits disques à l'aide d'un poinçon à biopsie de 500 µm de diamètre. Le diamètre rapporté pour chaque TMD correspond à la moyenne de deux mesures perpendiculaires de la largeur prises sur la projection maximale de la séquence d'images acquise au microscope confocal.

La *Figure 3.1A* montre la médiane des mesures de diamètre, groupées par type de TMD. Une légère variation du diamètre en fonction du type de tissu peut être observée en plus d'une

importante variabilité pour un même type de tissu. Ces différences peuvent être dues aux propriétés mécaniques variables des tissus tumoraux, en particulier leur élasticité [58]. On s'attend à ce qu'un tissu plus élastique s'étire davantage lors du sectionnement à cause de la force de compression appliquée par le poinçon à biopsie sur celui-ci. Après avoir été sectionné, le tissu reprendrait sa configuration initiale relaxée, ce qui aurait pour effet de produire une TMD plus petite que dans le cas d'un tissu moins élastique. Une autre cause possible de fluctuations du diamètre provient de la réduction graduelle du diamètre du poinçon causée par son usure.

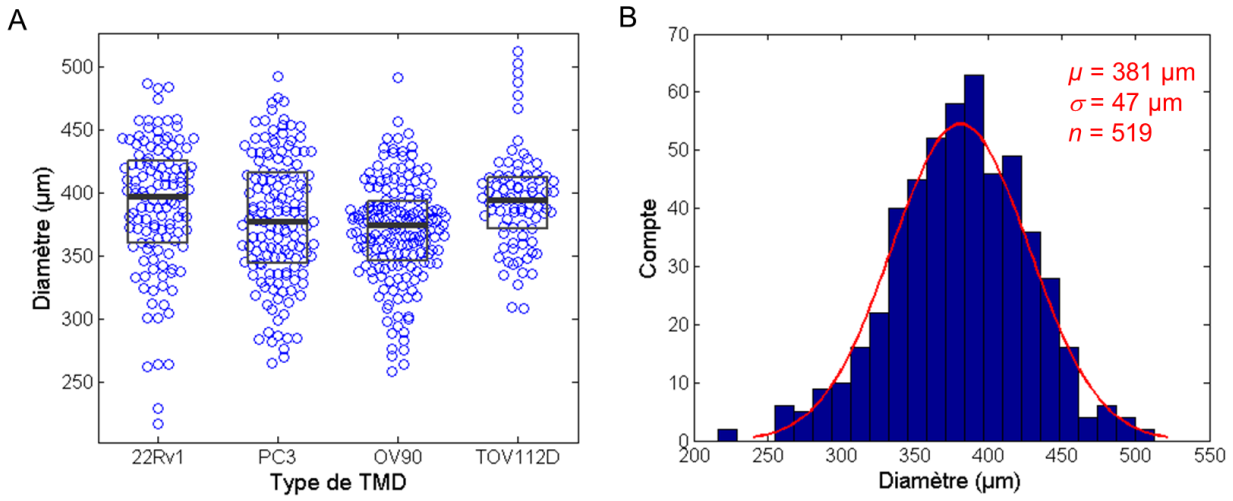


Figure 3.1: Diamètres des TMD mesurés sur les projections maximales des séquences d'images acquises par microscopie confocale. A) Superposition des mesures individuelles pour chaque TMD (cercles bleus, l'éparpillement en x est fonction de la densité des points à un diamètre donné) et du diagramme de quartiles (médiane : ligne noire épaisse et quartiles : bords inférieur et supérieur de la boîte noire) pour chaque type de tissu analysé. B) Histogramme (barres bleues) de tous les diamètres mesurés pour un nombre total (n) de 519 TMD, indépendamment du type de tissu et ajustement gaussien de la distribution (courbe rouge).

La *Figure 3.1B* montre l'histogramme de tous les diamètres mesurés indépendamment du type de tissu. La distribution semble suivre une loi gaussienne de moyenne (μ) égale à 381 µm et d'écart-type (σ) égal à 47 µm. 90% des TMD avaient donc un diamètre entre 303 µm et 458 µm. La hauteur des TMD n'a toutefois pas été mesurée, mais le déplacement vertical de coupe au vibratome a toujours été fixé à 300 µm. La hauteur des TMD devrait donc être près de cette valeur, faisant des TMD des échantillons cylindriques de rapport d'aspect (hauteur/diamètre) près de 1. La

taille des TMD s'apparente donc à celle de sphéroïdes matures après sept jours de formation en gouttelettes suspendues (voir *Tableau 3.1*).

En réponse à l'objectif 1 du projet de maîtrise, la procédure de coupe a donc permis de produire des TMD de forme discoïdale aux dimensions reproductibles d'environ 380 µm de diamètre par 300 µm de haut. La taille assez uniforme des TMD facilite leur manipulation et permet de concevoir des systèmes d'incubation mieux adaptés. Ces dimensions peuvent être utiles pour effectuer des simulations numériques nécessaires à la caractérisation complète du mode de piégeage et de la stabilité des TMD dans leurs puits, entre autres. La prochaine section caractérise le système dans lequel sont cultivées les TMD, plus particulièrement ce qui leur permet d'être piégées de manière stable et de survivre au sein du microsystème conçu dans le cadre de ce projet.

3.2 Caractérisation de la plateforme microfluidique

3.2.1 Mécanisme de piégeage des TMD

Une fois positionnée au-dessus d'un puits microfluidique, il a été observé expérimentalement qu'une TMD sédimente jusqu'au fond de celui-ci en une à deux secondes. Deux conditions doivent être respectées pour que le piégeage par sédimentation se produise : les TMD doivent être d'une densité supérieure à celle du milieu environnant et le temps de sédimentation doit être inférieur au temps de convection au-dessus des pièges.

3.2.1.1 Critère 1 : densité des TMD

Premièrement, les cellules sont sensiblement plus denses que le milieu dans lequel on les cultive, ce qui remplit la première condition. Les organelles et les protéines qu'elles contiennent sont simplement plus denses qu'une solution isotonique. D'ailleurs, cette caractéristique est exploitée dans les cultures en boîtes de Pétri où les cellules doivent sédimenter au fond de la boîte afin de former un tapis cellulaire en adhérant à la surface.

L'équation décrivant la vitesse en régime permanent d'une sphère qui sédimente dans un compartiment infini de fluide (équation 3-1) peut être dérivée de la deuxième loi de Newton, tel que montré ci-dessous, en considérant la force de friction (F_{friction}) s'opposant à la force gravitationnelle ($F_{\text{gravité}}$) exercée sur une particule sphérique.

$$\sum F = m \cdot a$$

$$F_{\text{friction}} + F_{\text{gravité}} = m_{\text{eff}} \cdot a$$

$$-3\pi\eta d \cdot v + m_{\text{eff}} g = m_{\text{eff}} \cdot \frac{dv}{dt}$$

$$v_{\text{sed}} = \frac{\Delta\rho g \left(\frac{\pi d^3}{6}\right)}{3\pi\eta d}\left(1 - e^{-3\pi\eta dt/\left(\frac{\Delta\rho\pi d^3}{6}\right)}\right)$$

F: force
m: masse
m_{eff}: masse effective de la particule
a: accélération
d: diamètre de la particule sphérique
η: viscosité du fluide
v: vitesse de la particule
t: temps
$\Delta\rho$: densité effective, $\rho_{\text{particule}} - \rho_{\text{milieu}}$

En régime permanent :

$$v_{\text{sed}} = \frac{\Delta\rho g d^2}{18\eta} \tag{3-1}$$

Cette équation montre qu'à densités égales, des sphères plus grandes sédimentent beaucoup plus rapidement, proportionnellement à leur diamètre au carré. Cela explique pourquoi cette approche de piégeage est applicable pour les TMD (d ~380 µm) et paraît bien moins intéressante pour les cellules individuelles (d ~10 µm), qui sédimentent environ 1500 fois moins vite dans un milieu infini. La technique de piégeage par sédimentation est donc plus attrayante pour des morceaux de tissu de diamètre supérieurs à quelques centaines de micromètres, tels que les TMD.

Cependant, dans le cas du microsystème à l'étude, l'équation 3-1 doit être corrigée pour les dimensions finies du milieu entourant les TMD. En effet, puisque la largeur des puits microfluidiques de 600 µm est seulement légèrement plus grande que le diamètre des TMD, les côtés des puits ralentissent significativement le processus de sédimentation en ajoutant une composante de friction au mouvement des particules. Néanmoins, il a été observé expérimentalement que les TMD sédimentent typiquement jusqu'au fond des puits – sur une distance totale de 500 µm – en moins de deux secondes. Leur vitesse de sédimentation vaut donc plus de 0,25 mm/s, ce qui est au plus 7,5 fois plus lent que la vitesse moyenne de 1,86 mm/s mesurée en milieu infini (*Tableau 3.1*).

Le temps de sédimentation de quelques TMD, dont le diamètre avait préalablement été mesuré, a été chronométré sur une distance de 5 cm, dans un tube de 1,1 cm de large. Le ratio du diamètre de la particule sur le diamètre du tube vaut ~0,035, alors l'effet du bord du tube a pu être négligé. La vitesse de sédimentation calculée correspond donc à celle dans un milieu infini. De ces mesures de vitesse, la densité du tissu a été approximée à l'aide de l'équation 3-1 en supposant une

particule sphérique d'un diamètre correspondant à celui trouvé pour chaque TMD. Le *Tableau 3.1* regroupe les moyennes de vitesses de sédimentation, de diamètres et les approximations des densités correspondantes pour différents types de tissu.

Tableau 3.1: Vitesses de sédimentation dans un milieu infini ($v_{\mathrm{sed,inf}}$), approximation de densités relatives ($\Delta\rho$) par rapport au HBSS et de densités absolues (ρ) pour différents types de tissus

Type de tissu	$\boldsymbol{v_{\mathrm{sed,inf}}}$ **(mm/s)**	$\boldsymbol{d}$ **(µm)**	$\boldsymbol{\Delta\rho}$ **(kg/m³)**	$\boldsymbol{\rho}$ **(kg/m³)**	$\boldsymbol{n}$
TMD 22Rv1 (jour 1)	1,92 ± 0,67	385 ± 31	21 ± 6	1027 ± 6	14
TMD PC3 (jour 1)	0,77 ± 0,18	350 ± 15	10 ± 2	1016 ± 2	5
TMD OV90 (jour 1)	2,08 ± 0,48	392 ± 26	22 ± 6	1028 ± 6	7
Moyenne TMD	1,59 ± 0,71	376 ± 22	18 ± 7	1024 ± 7	
Sphéroïde OV90 (jour 7)	2,77 ± 0,3	412 ± 43	27 ± 6	1033 ± 6	20
Sphéroïde TOV112D (jour 7)	1,78 ± 0,54	366 ± 79	22 ± 6	1028 ± 6	29
Moyenne sphéroïdes	2,27 ± 0,70	389 ± 33	25 ± 4	1031 ± 4	
Moyenne TMD et sphéroïdes	1,86 ± 0,72	381 ± 24	21 ± 6	1027 ± 6	

Chaque mesure est exprimée par la moyenne pour un nombre (n) d'échantillons ± l'écart-type. Les moyennes et écart-types des trois mesures de TMD, des deux mesures de sphéroïdes et du total des cinq mesures de tissus sont aussi montrées.

Il est intéressant de noter que la densité trouvée pour les TMD de xénogreffe OV90 au premier jour après la récolte est très similaire à la densité trouvée pour les sphéroïdes formés du même type de cellule après sept jours de culture en gouttelettes suspendues. On peut donc s'attendre à ce que ces deux types de tissus sédimentent de manière similaire dans les microsystèmes. À l'exception des TMD de xénogreffe PC3, toutes les densités relatives trouvées pour les différents types de tissus, autant pour les TMD que pour les sphéroïdes, se situent autour de la moyenne de 21 kg/m^3. Cette densité relative a été calculée par rapport au HBSS, soit le milieu de chargement des TMD dans la plateforme. On trouve donc une densité absolue moyenne du tissu autour de 1027 kg/m^3 étant donné une densité approximative du HBSS de 1006 kg/m^3. L'expérience a été répétée à deux reprises pour les TMD de xénogreffe 22Rv1, et des résultats très similaires ont été obtenus (22 ± 8 kg/m^3 à la première expérience et 21 ± 5 kg/m^3 à la deuxième). Il pourrait être intéressant de répéter l'expérience pour des TMD de xénogreffe PC3 afin de vérifier si la densité relative plus de deux fois plus faible est une caractéristique intrinsèque de ce type de tissu et, si tel est le cas, de tenter d'identifier la cause de cette différence. Une cause possible pourrait être une plus faible densité cellulaire du tissu. Dans tous les cas, cette différence de densité

pourrait être exploitée pour valider expérimentalement, avec plus d'un point, certains résultats de simulation, tels que le débit minimal d'éjection des particules des puits qui est fonction de la densité du tissu.

3.2.1.2 Critère 2 : temps de convection des TMD au-dessus du puits

Pour remplir le deuxième critère, soit que le temps de convection au-dessus du puits soit supérieur au temps de sédimentation, les TMD ont été manipulées à l'aide d'une micropipette contrôlée par l'utilisateur. Celui-ci a pu choisir la direction de mouvement des TMD dans le canal en aspirant ou en expulsant du liquide à la sortie du microsystème, et a pu les arrêter lorsqu'elles étaient positionnées au-dessus d'un puits pour leur laisser le temps de sédimenter jusqu'au fond. Cette méthode s'est avérée rapide et efficace. Cinq TMD ont généralement pu être piégées dans un système en moins d'une minute.

Si une approche automatisée avait plutôt été adoptée où les TMD avaient été contrôlées à débit constant par une pompe connectée au canal, l'étape de chargement aurait été plus longue et le taux de succès aurait probablement été plus faible. D'abord, un débit assez lent aurait été fixé, afin de s'assurer que le temps de convection demeure plus grand que le temps de sédimentation pour la majorité des TMD malgré des variations de taille et de densité. En supposant qu'une particule ayant sédimenté sur une distance correspondant à son demi-diamètre (190 µm) avant d'avoir traversé le puits se trouve piégée, le temps de sédimentation moyen à respecter serait d'environ 1,6 secondes pour une particule moins dense ($\Delta\rho = 10$ kg/m^3) ou de 0,6 secondes pour une particule plus dense ($\Delta\rho = 27$ kg/m^3). Ces temps de sédimentation ont été trouvés en utilisant les vitesses de sédimentation en milieu infini (équation 3-1) divisées par un facteur 7,5 pour tenir compte des dimensions finies du système. Afin d'assurer la capture d'une majorité de TMD, le temps de sédimentation pour les particules de densité plus faible a été utilisé pour calculer le débit de 8,1 µL/min qui devrait être appliqué dans le système. Le volume total du canal étant égal à 29 µL, le processus de chargement automatisé prendrait environ 3,5 minutes pour faire avancer les TMD de l'entrée du canal jusqu'au dernier piège. En plus de prendre plus de temps que la méthode manuelle, cette méthode automatisée risquerait d'entraîner le piégeage de plusieurs échantillons dans un même puits. Aussi, certains types de tumeurs ont plus tendance à adhérer aux surfaces des canaux, ce qui poserait davantage problème à faible débit par la méthode automatisée.

Pour être piégées par sédimentation, les TMD doivent donc être plus denses que le milieu de chargement et avoir suffisamment de temps, soit une à deux secondes, pour se déposer au fond des pièges. La première condition est respectée par la nature même des TMD dont la densité a été approximée à 1027 kg/m^3 en se basant sur des résultats expérimentaux de sédimentation en milieu infini. La deuxième condition est aussi facilement respectée par l'usager lors du chargement manuel des TMD dans les microsystèmes. Les forces de cisaillement et d'éjection auxquelles sont soumises les TMD une fois piégées sont traitées dans les prochaines sections.

3.2.2 Contraintes de cisaillement

Le microsystème conçu prévient contre des forces de cisaillement trop élevées autour du tissu qui pourraient endommager les cellules à sa surface ou favoriser sa fragmentation. En effet, les TMD ont été soumises à de très petites contraintes de cisaillement, même à des débits relativement élevés. Pour trouver une valeur limite supérieure à cette contrainte, elle a été calculée sur la paroi inférieure du canal, au point (*p*) indiqué à la *Figure 3.2* où la dérivée du profil de vitesse dans la section transverse est à son maximum à cause d'un écoulement de Hagen-Poiseuille.

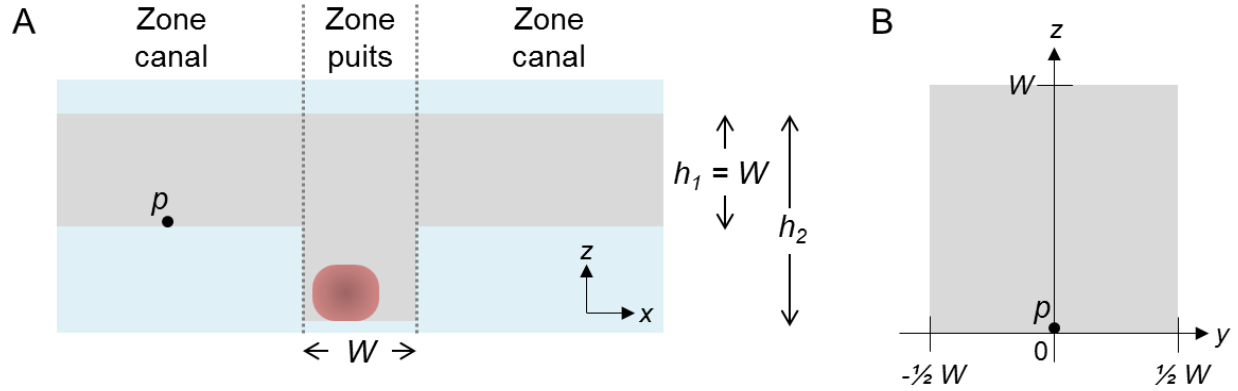


Figure 3.2: Définition des variables et des dimensions du système pour le calcul de la contrainte de cisaillement maximale. A) Vue de côté du canal et d'un puits où une TMD est piégée. B) Section transverse du canal prise dans la zone canal et définition du système d'axes. Le point (p) indique l'endroit où la contrainte de cisaillement est calculée.

Le profil de vitesse $v_x(y,z)$ dans un canal à section carrée de largeur W est représenté par l'équation 3-2, dérivée des équations de Navier-Stokes en posant des vitesses nulles aux parois comme conditions aux frontières (voir la définition du système d'axes à la *Figure 3.2*) [59]. ΔP est

la variation de pression entre l'entrée et la sortie du canal, η est la viscosité dynamique du milieu et L est la longueur totale du canal.

$$v_{\mathrm{x}}(y,z) = \frac{4W^2\Delta P}{\pi^3\,\eta L}\sum_{\text{n impairs}}\frac{1}{n^3}\left[1-\frac{\cosh\left(\frac{n\pi y}{W}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi}{2}\right)}\right]\sin\left(\frac{n\pi z}{W}\right) \tag{3-2}$$

Le cisaillement maximal dans tout le système se trouve au centre des parois du canal, c'est-à-dire aux coordonnées (y, z) = (0, 0), (W/2, W/2), (-W/2, W/2) et (0, W). La contrainte de cisaillement sur une surface se calcule comme la viscosité multipliée par le gradient de la vitesse du fluide dans la direction perpendiculaire à la surface, tel que décrit à l'équation 3-3 [60]. La contrainte au point p = (0, 0) peut être calculée comme suit.

$$\sigma_{\mathrm{zx}}(y,z) = \eta\frac{\partial v_{\mathrm{x}}}{\partial z} \tag{3-3}$$

$$\sigma_{\mathrm{zx}}(y,z) = \frac{4W^2\Delta P}{\pi^3 L}\sum_{\text{n impairs}}\frac{\pi}{n^2 W}\left[1-\frac{\cosh\left(\frac{n\pi y}{W}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi}{2}\right)}\right]\cos\left(\frac{n\pi z}{W}\right)$$

$$\sigma_{\mathrm{zx}}(0,0) = \frac{4W^2\Delta P}{\pi^3 L}\sum_{\text{n impairs}}\frac{\pi}{n^2 W}\left[1-\frac{1}{\cosh\left(\frac{n\pi}{2}\right)}\right] \tag{3-4}$$

Supposons une variation de pression entre l'entrée et la sortie du canal de 85,6 Pa associée à un débit de 5 µL/s, représentatif du débit maximal imposé lors de la procédure de changement de milieu. Pour la largeur de canal (W) égale à 600 µm, la contrainte de cisaillement sur la paroi calculée à l'aide de l'équation 3-4 vaut 0,22 Pa ou 2,2 dyne/cm^2. Cette valeur est prise dans la région du dispositif où la vitesse est maximale. En effet, le changement de hauteur du canal de h_1 à h_2 au niveau des puits (*Figure 3.2*) provoque un ralentissement de la vitesse du fluide au-dessus de l'échantillon. La valeur calculée ci-dessus peut donc être considérée comme une valeur plafond pour la contrainte de cisaillement sur les TMD. Elle est en-dessous des valeurs critiques d'environ 10 dyne/cm^2 causant la mort de certaines cellules de mammifères [61] et bien en-deçà de valeurs d'environ 3000 dyne/cm^2 causant le détachement de monocouches de cellules de fibroblastes [62]. Pendant le chargement des TMD, les contraintes de cisaillement exercées sur les surfaces du tissu

sont aussi considérées très faibles puisque les TMD circulent avec le courant et ainsi, la vitesse relative des TMD par rapport au fluide entre la surface du tissu et la paroi du canal tend vers zéro.

En somme, autant au moment du chargement des TMD qu'au moment où le milieu est renouvelé dans les systèmes, les TMD ne sont soumises qu'à de faibles contraintes de cisaillement. Ceci est une conséquence directe du mode de piégeage choisi où les échantillons se trouvent protégés à l'intérieur de leur puits microfluidique, même lorsque des débits élevés sont imposés dans le canal. Une autre caractéristique intéressante des systèmes résultant de ce mode de piégeage est la stabilité des TMD dans les systèmes, tel que détaillé à la prochaine section.

3.2.3 Stabilité des TMD dans les puits microfluidiques

La position des TMD au fond des puits est très stable, à moins que des hauts débits ne soient appliqués. Avec l'augmentation de la vitesse du fluide dans les canaux, des effets inertiels pourraient entraîner l'éjection des TMD.

Le nombre de Reynolds (équation 3-5) représente le ratio des forces inertielles sur les forces visqueuses et il peut être utilisé pour déterminer quelles forces dominent dans le système à différents débits. Dans les systèmes à l'étude, il est difficile de caractériser complètement la vitesse autour des échantillons. On peut tout de même trouver des approximations des bornes supérieure et inférieure à la valeur du nombre de Reynolds en constatant que la vitesse dans la zone du puits ne peut pas dépasser la vitesse au sein du canal de hauteur $h_1 = W = 0{,}6$ mm, ni être inférieure à la vitesse qui serait trouvée dans un canal de hauteur $h_2 = 1{,}1$ mm (définitions de h_1 et h_2 à la *Figure 3.2*). La longueur caractéristique (L_c) utilisée est la hauteur h_2 de la zone du piège. v est la vitesse moyenne, Q est le débit, puis ρ et η sont respectivement la densité et la viscosité dynamique du milieu.

$$Re = \frac{\rho v L_c}{\eta} \tag{3-5}$$

$$\frac{\rho Q}{W\eta} < Re < \frac{\rho Q h_2}{W^2 \eta}$$

Ainsi, on trouve que le régime est laminaire et les forces visqueuses dominent jusqu'à un débit d'environ 2 à 3,6 µL/min ($Re < 0{,}1$) tandis que le régime reste laminaire et les forces inertielles dominent lorsque le débit dépasse environ 200 à 360 µL/min ($Re > 10$).

L'un des effets inertiels pouvant provoquer l'éjection du tissu est le gradient de pression qui se développe entre l'échantillon et le canal en suivant le principe de Bernoulli. Ce gradient peut créer suffisamment de portance sur l'échantillon pour vaincre la force gravitationnelle et les autres effets hydrodynamiques agissant à maintenir la TMD au fond du puits. La libération des échantillons de leurs puits a été observée expérimentalement à des débits supérieurs à 800 µL/min. Le débit maximal induit dans les canaux à l'aide d'une micropipette est de 5 µL/s = 300 µL/min. À ce régime d'opération, les échantillons restent dans les puits même si les effets inertiels dominent. La géométrie des puits confine donc suffisamment les échantillons de sorte qu'ils ne sont pas libérés à des débits normaux d'opération.

Cette stabilité dépendante du débit pourrait être utilisée, au besoin, pour extraire les échantillons du microsystème pour fins d'analyse externe ou pour les acheminer dans un autre module microfluidique, à condition que les surfaces du dispositif soient suffisamment bien traitées pour prévenir l'adhérence des MDT au fond des puits.

La résistance hydraulique totale des microsystèmes conçus est de 1,71 x 10^{10} Pa s/m^3. Pour induire un débit de 800 µL/min pouvant éjecter les particules, il faudrait générer une différence de pression (ΔP) de 0,2 kPa. Cette différence de pression est difficile à produire par simple perturbation de la plateforme. Par exemple, il faudrait ajouter du liquide jusqu'à une hauteur de 2 cm dans l'entrée du système pour créer une telle pression. En cas d'inclinaison du système, deux effets se combinent pour favoriser l'éjection des particules. Premièrement, un débit est induit à cause de la différence de hauteur de la colonne de liquide entre l'entrée et la sortie espacées de 17 mm. Deuxièmement, la composante de la force gravitationnelle s'opposant à la force d'éjection est réduite. Par exemple, pour un angle de 45°, une différence de pression de 0,12 kPa serait induite, insuffisante à elle seule pour entraîner l'éjection. Toutefois, à cet angle, la composante de la force gravitationnelle s'opposant à l'éjection correspondrait à seulement 70% de la force gravitationnelle totale s'appliquant sur le tissu. Ces deux effets additionnés pourraient entraîner l'éjection, mais la plateforme devrait être inclinée à un angle d'environ 50° en supposant une relation directe de

proportionnalité entre le débit d'éjection minimal et l'amplitude de la composante de la force gravitationnelle s'opposant à l'éjection.

Enfin, il peut être conclu que le piégeage des échantillons est stable dans les microsystèmes : les échantillons peuvent résister aux débits normaux induits lors de la procédure de changement de milieu ainsi qu'à des perturbations légères lors de la manipulation des plateformes. Cela constitue une amélioration importante comparativement aux systèmes à piégeage résistif précédemment utilisés au laboratoire, tel que discuté à la section 4.1.

En réponse à l'objectif 2, une plateforme microfluidique a été conçue pour permettre de piéger les TMD de manière stable en minimisant les contraintes de cisaillement. Chaque plateforme, de par sa conception, permet d'exposer les TMD piégées à différentes conditions grâce aux cinq canaux indépendants qu'elle comporte (voir la section 2.2 pour une description détaillée du design).

3.2.4 Transport d'oxygène et de nutriments sans perfusion

Au sein de la plateforme, la diffusion entre le canal du haut et l'intérieur des puits permet aux TMD d'obtenir des nutriments, d'être exposées aux agents chimiques du milieu et de disposer de leurs déchets cellulaires. Après l'ajout de milieu frais dans les canaux, les nutriments du canal diffusent graduellement jusque dans les puits pour être consommés par les TMD alors que les déchets produits diffusent dans la direction opposée vers l'extérieur des puits. Puisque le temps de diffusion d'une molécule dépend en partie de sa taille, des petites molécules comme des ions diffusent rapidement dans les puits alors que des molécules plus larges comme le glucose prennent plus de temps à diffuser jusqu'aux TMD. En suivant l'approximation du temps de diffusion décrite à l'équation 3-6 [59], une molécule de glucose ayant une constante de diffusion (D) dans l'eau de 600 $\mu m^2/s$ prendrait approximativement 3,5 minutes à diffuser sur une distance totale (x) de 500 µm jusqu'au fond d'un puits. Les petites dimensions du système facilitent donc le transport par diffusion des nutriments qui se fait dans des délais raisonnables.

$$t \approx \frac{x^2}{2D} \tag{3-6}$$

3.2.4.1 Calcul du rayon critique d'un tissu tumoral sphérique pour éviter l'anoxie

Les premières analyses de l'effet de l'hypoxie sur la mort cellulaire dans des tissus tumoraux remontent à plus d'un demi-siècle. En 1955, Thomlinson et Gray [63] ont étudié expérimentalement la distribution de mort cellulaire dans des échantillons de tumeurs de poumons prélevés par chirurgie. Ils ont constaté que le pourtour de leurs échantillons cylindriques était majoritairement vivant alors que leur cœur montrait des signes de mort cellulaire abondante. Par un modèle de diffusion simple, ils ont fait le calcul théorique approximatif de la distribution d'oxygène à l'intérieur des tissus étudiés en supposant une constante de diffusion dans le milieu et dans le tissu correspondant à celle du dioxygène dans l'eau.

En considérant une réaction d'ordre 0 où le rythme de consommation d'oxygène ne dépend pas de sa concentration, ils ont trouvé une relation entre le rayon critique calculé pour éviter l'anoxie (déplétion complète d'oxygène) au centre du tissu et le rayon des structures cylindriques de tumeurs mesuré expérimentalement à partir de coupe histologiques. Un raisonnement similaire, présenté ci-dessous, peut être suivi pour calculer de manière approximative le rayon critique d'échantillons de tumeur de forme sphérique.

Pour résoudre ce problème, deux sous-domaines délimités par la surface de l'échantillon sphérique doivent être considérés. Dans le premier sous-domaine du tissu, il y a diffusion et consommation d'oxygène. Dans le second sous-domaine du milieu environnant, l'oxygène diffuse seulement. Les variables utilisées pour la résolution du problème sont décrites dans le *Tableau 3.2*.

Tableau 3.2: Description des variables pour le calcul de la concentration d'oxygène dans un échantillon de tissu tumoral et dans le milieu environnant

Variable	Description	Valeur	Source
$C_{\max}$	Concentration maximale de dissolution de l'oxygène dans l'eau à 37°C et à 0,2 atm.	0,20 mol/m^3	Loi de Henry [64]
$Q = \frac{q}{\rho}$	Débit maximal de consommation d'oxygène pour une masse humide de tissu cancéreux	25 µL O_2/g/min = 1,70 x 10^{-5} mol/kg/s	[65]
ρ	Densité moyenne du tissu cancéreux	1027 kg/m^3	§ 3.2.1.1
D_{T}	Constante de diffusivité de l'oxygène dans le tissu cancéreux à 37°C	1,75 x 10^{-9} m^2/s	[66]
D_{M}	Constante de diffusivité de l'oxygène dans l'eau à 37°C	~2,6 x 10^{-9} m^2/s	[67]
q	Débit maximal de consommation d'oxygène pour un volume de tissu		
R_{crit}	Rayon critique du tissu de forme sphérique		
$C_{\mathrm{T}}(r)$	Concentration d'oxygène dans le tissu à un rayon $r < R_{\mathrm{crit}}$		
$C_{\mathrm{M}}(r)$	Concentration d'oxygène dans le milieu environnant à un rayon $r > R_{\mathrm{crit}}$		
C_0	Concentration à la surface du tissu		

3.2.4.1.1 Sous-domaine du tissu

Considérons un échantillon sphérique dans un milieu infini aqueux saturé d'oxygène. Sans perfusion, l'équation de convection-diffusion se simplifie à ses termes de diffusion, mais un terme (q) est soustrait pour tenir compte de la consommation continuelle d'oxygène par les cellules. Dans ce modèle simplifié de réaction d'ordre 0, q est une constante qui ne dépend ni du temps, ni de la concentration d'oxygène présente, ni de la position dans le tissu. En régime permanent ($\partial C / \partial t = 0$) et après avoir développé l'expression de l'opérateur laplacien en coordonnées sphériques où les termes relatifs aux angles θ et φ ne sont pas retenus puisque la concentration varie seulement suivant le rayon (r), l'équation se simplifie et peut être résolue pour $C(r)$ en intégrant deux fois.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C - q \tag{3-7}$$

$$0 = D_{\mathrm{T}} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r}\left(r^2 \frac{\partial C_{\mathrm{T}}}{\partial r}\right) - q$$

1ère intégration :

$$r^2 \frac{\partial C_{\mathrm{T}}}{\partial r} = \frac{q r^3}{3 D_{\mathrm{T}}} + A$$

2e intégration :

$$C_{\mathrm{T}}(r) = \frac{q r^2}{6 D_{\mathrm{T}}} + \frac{A}{r} + B$$

A et B sont des constantes d'intégration dont les valeurs peuvent être trouvées en utilisant les conditions aux frontières. Premièrement, puisqu'on veut trouver le rayon critique du tissu (R_{crit}) tel que l'oxygène consommé par celui-ci soit tout juste égal à l'oxygène disponible par diffusion, la concentration à $r = 0$ en régime permanent vaut 0. Deuxièmement, on pose une concentration quelconque $C_{\mathrm{T}}(R_{\mathrm{crit}}) = C_0$ à la surface du tissu. Pour respecter la première condition, il faut que $A = B = 0$. À partir de la seconde condition, on trouve l'équation 3-8.

$$C_0 = \frac{q {R_{\mathrm{crit}}}^2}{6 D_{\mathrm{T}}} \tag{3-8}$$

La concentration d'oxygène dans le sous-domaine du tissu suit donc la relation décrite à l'équation 3-9.

Sous-domaine tissu :
($r < R_{\mathrm{crit}}$)

$$C_{\mathrm{T}}(r) = \frac{qr^2}{6D_{\mathrm{T}}} \tag{3-9}$$

3.2.4.1.2 Sous-domaine du milieu environnant

Dans le sous-domaine du milieu environnant à l'extérieur du tissu, le terme q de l'équation 3-7 tombe à zéro puisqu'il n'y a aucune cellule dans cette région pour consommer l'oxygène. Une fois développée, l'expression simple peut encore être résolue pour $C(r)$ en intégrant deux fois.

$$0 = D_{\mathrm{M}} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r}\left(r^2 \frac{\partial C_{\mathrm{M}}}{\partial r}\right)$$

1ère intégration :

$$\frac{\partial C_{\mathrm{M}}}{\partial r} = \frac{E}{r^2}$$

2e intégration :

$$C_{\mathrm{M}}(r) = F - \frac{E}{r}$$

E et *F* sont des constantes d'intégration dont les valeurs peuvent être trouvées en utilisant les conditions aux frontières à l'extérieur du tissu. Premièrement, la concentration à l'infini vaut la concentration maximale d'oxygène dissout dans l'eau à 37°C (C_{max}) à pression ambiante partielle d'oxygène dans un incubateur à cellules (0,20 atm) et deuxièmement, la continuité du profil de concentration exige que la concentration à l'interface avec le tissu ($C_{\mathrm{M}}(R_{\mathrm{crit}})$) vaille encore la concentration arbitraire C_0. La concentration d'oxygène dans le sous-domaine du milieu environnant suit donc la relation décrite à l'équation 3-10.

1ère condition : $$F = C_{\max}$$

2e condition: $$E = R_{\text{crit}}(C_{\max} - C_0)$$

Sous-domaine milieu : ($r > R_{\text{crit}}$)

$$C_{\text{M}}(r) = C_{\max} - \frac{R_{\text{crit}}(C_{\max} - C_0)}{r} \tag{3-10}$$

Pour respecter un bilan massique (conservation des espèces en présence), les concentrations ainsi que les flux de molécules des deux sous-domaines doivent être égaux à l'interface $r = R_{\text{crit}}$.

Condition de continuité des flux :

$$-D_{\text{T}} \left.\frac{\partial C_{\text{T}}}{\partial r}\right|_{r=R_{\text{crit}}} = -D_{\text{M}} \left.\frac{\partial C_{\text{M}}}{\partial r}\right|_{r=R_{\text{crit}}}$$

$$\frac{qR_{\text{crit}}}{3} = \frac{D_{\text{M}}(C_{\max} - C_0)}{R_{\text{crit}}}$$

En utilisant C_0 de l'équation 3-8 :

$$\frac{qR_{\text{crit}}}{3} = \frac{D_{\text{M}}\left(C_{\max} - \frac{q{R_{\text{crit}}}^2}{6D_{\text{T}}}\right)}{R_{\text{crit}}}$$

$$R_{\text{crit}} = \sqrt{\frac{6D_{\text{T}}D_{\text{M}}C_{\max}}{\rho\, Q(2D_{\text{T}} + D_{\text{M}})}} \tag{3-11}$$

Le profil de la concentration d'oxygène suivant le rayon allant du centre vers l'extérieur de l'échantillon est tracé à la *Figure 3.3*. Pour un rayon infini, la concentration vaut la concentration maximale de dissolution de l'oxygène dans l'eau ($C_{\max}$). En s'approchant du tissu, la concentration décroit suivant une relation proportionnelle à $1/r$ (équation 3-10). Puis à la surface avec le tissu, à $r = R_{\text{crit}}$, le régime change et la concentration devient plutôt proportionnelle à r^2 (équation 3-9).

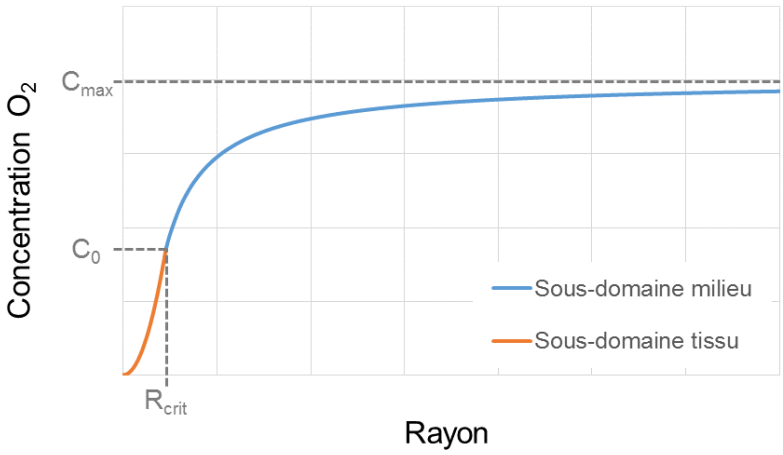


Figure 3.3: Profil de la concentration d'oxygène à l'intérieur et autour d'un échantillon sphérique de tissu en fonction du rayon tel que défini dans les deux sous-domaines du problème. Les unités des axes sont arbitraires.

En appliquant dans l'équation 3-11 les valeurs numériques compilées au *Tableau 3.2*, un rayon critique de $R_{\text{crit}} = 226\ \mu\text{m}$ est trouvé. Ainsi, selon ce modèle, il serait impossible de maintenir en vie un échantillon sphérique de tumeur ayant un diamètre supérieur à $2R_{\text{crit}} \approx 450\ \mu\text{m}$. Par ailleurs, la sphère est la géométrie qui permet le transport diffusif le plus rapide comparativement à d'autres géométries de dimensions caractéristiques $2R_{\text{crit}}$. Par exemple, le temps caractéristique de diffusion dans une tranche plane de tissu d'épaisseur $2R_{\text{crit}}$ est quatre fois plus grand que pour une sphère de même diamètre. Ce calcul théorique constitue donc la justification fondamentale du concept de découpe d'échantillons de tumeurs à des dimensions inférieures au seuil critique d'anoxie pour maximiser la viabilité du tissu. Elle justifie aussi le choix de ne pas perfuser le tissu sachant que cela simplifie grandement le protocole expérimental. En effet, l'ajout de perfusion nécessiterait la présence de pompes seringues et de connections fluidiques encombrantes à l'intérieur de l'incubateur.

De plus, l'effet de la perfusion peut être évalué grâce au modèle précédent. En présence de perfusion, le transport diffusif se trouve augmenté vers la surface de l'échantillon grâce à l'apport convectif de nutriments vers celle-ci. À la limite, lorsque la convection est très rapide, la diffusivité efficace des nutriments dans le milieu environnant tend vers l'infini (le transport se fait à travers une couche limite diffusive d'épaisseur négligeable). Dans cette situation, l'équation 3-11 se réduit à l'équation 3-12 ci-dessous.

$$R_{\mathrm{P}} = \sqrt{\frac{6D_{\mathrm{T}}C_{\max}}{\rho\, Q}} \approx \sqrt{3}R_{\mathrm{SP}} \tag{3-12}$$

R_{P} est le rayon critique perfusé et R_{SP} est le rayon critique sans perfusion. Ainsi, selon ce modèle, la perfusion rapide des échantillons aurait pour effet de permettre la survie sans anoxie d'échantillons de diamètres 1,7 fois plus grands. Nos échantillons étant inférieurs en taille à R_{SP}, nous justifions ainsi la décision de ne pas perfuser les échantillons dans les expériences présentées.

En réalité, les TMD sont piégées dans un microsystème en PDMS et non dans un milieu infini de fluide. Toutefois, puisque le PDMS a une constante de diffusivité pour l'oxygène très similaire à celle de l'eau et puisque la concentration maximale de dissolution de l'oxygène dans le PDMS est plus grande (~0,9 mol/m^3 [68]), la présence d'un microsystème en PDMS autour du tissu ne devrait pas diminuer la valeur du rayon critique trouvé. Aussi, il est connu que les cellules peuvent moduler leur consommation d'oxygène en fonction des concentrations disponibles [69], leur permettant ainsi de survivre dans des environnements pauvres en oxygène, ce qui n'a pas été tenu en compte dans ce calcul et aurait pour effet d'augmenter le rayon critique. Le modèle développé dans les équations 3-7 à 3-11 constitue donc une approximation permettant de calculer le rayon minimum à partir duquel l'anoxie devient possible. Les variables les plus incertaines du modèle théorique sont Q et ρ qui peuvent varier d'un type de tumeur à un autre.

En réponse au quatrième objectif de recherche, la détermination du profil de concentration d'oxygène dans le tissu et autour de celui-ci a permis de trouver un rayon critique au-dessus duquel le tissu tumoral risque de manquer d'oxygène. Ce rayon critique de 226 µm est supérieur au rayon moyen des TMD de 190 µm, ce qui permet de conclure que les échantillons produits ont tout juste la bonne taille pour éviter l'hypoxie, même en l'absence de perfusion. Des simulations numériques pourraient permettre de valider ces résultats à l'aide d'un modèle plus complet de la consommation d'oxygène.

3.2.4.2 Autres considérations sur la consommation de nutriments par les TMD

Puisque le PDMS est perméable aux gaz, un afflux d'oxygène est présent en permanence dans les microsystèmes malgré l'absence de perfusion. Cependant, les autres nutriments du milieu sont consommés jusqu'à leur épuisement ou jusqu'à ce que le milieu soit changé. Dans ce cas, à

cause de la géométrie particulière du microsystème à l'étude, une solution analytique simple n'existe pas et des simulations numériques devraient être produites pour étudier la consommation de glucose et d'autres nutriments par les TMD. Pour éviter l'épuisement des nutriments et l'accumulation des déchets, le milieu a été changé fréquemment au cours des expériences, généralement un, trois, six et huit jours après le chargement des TMD dans les systèmes. Sachant que des sphéroïdes de plus de 4000 cellules peuvent survivre pendant au moins sept jours dans une gouttelette de 16 µL (~2,3 µL/sphéroïde/jour) [30], une fréquence de changement de milieu allant de un à trois jours semblait raisonnable pour nos microsystèmes contenant 29 µL de milieu et cinq TMD (5,8 à 1,9 µL/TMD/jour).

En raison de la tridimensionnalité du tissu et de la consommation continuelle des nutriments par les cellules, des gradients de nutriments existent au sein de la TMD de la surface externe jusqu'au centre. Ces gradients sont désirables dans un modèle cellulaire, puisqu'ils sont similaires aux gradients naturels existant au sein du tissu *in vivo* [18]. Ces différentes concentrations des molécules peuvent entraîner des variations du comportement physiologique des cellules dans différentes régions du tissu [18], [63]. Les équations développées dans cette section montrent que la petite taille des TMD leur permet d'avoir accès à suffisamment d'oxygène dans un microsystème non perfusé. Toutefois, le milieu doit tout de même être changé fréquemment pour assurer que les autres nutriments ne s'épuisent pas du milieu et pour vider celui-ci des déchets cellulaires produits pendant l'incubation.

3.3 Viabilité sur puce des tumeurs micro-disséquées

Après avoir montré que les tumeurs peuvent être coupées de manière reproductible et validé qu'elles peuvent être piégées au sein d'un système microfluidique, il restait à valider expérimentalement que les TMD peuvent être maintenues en vie suffisamment longtemps pour que l'effet de chimiothérapies puisse être évalué dans des expériences subséquentes. Dans un contexte clinique, l'évaluation de l'efficacité de chimiothérapies devrait se faire rapidement afin que le résultat du test puisse aider à choisir la thérapie la plus appropriée, et ce dans le but d'initier le traitement du patient dès que possible. Il est aussi important que le tissu primaire cultivé *in vitro* soit traité dans des délais brefs afin d'éviter qu'un processus de différentiation des cellules se produise en réponse aux nouvelles conditions de culture. Ces critères ont permis de fixer la limite de l'étude de viabilité à huit jours.

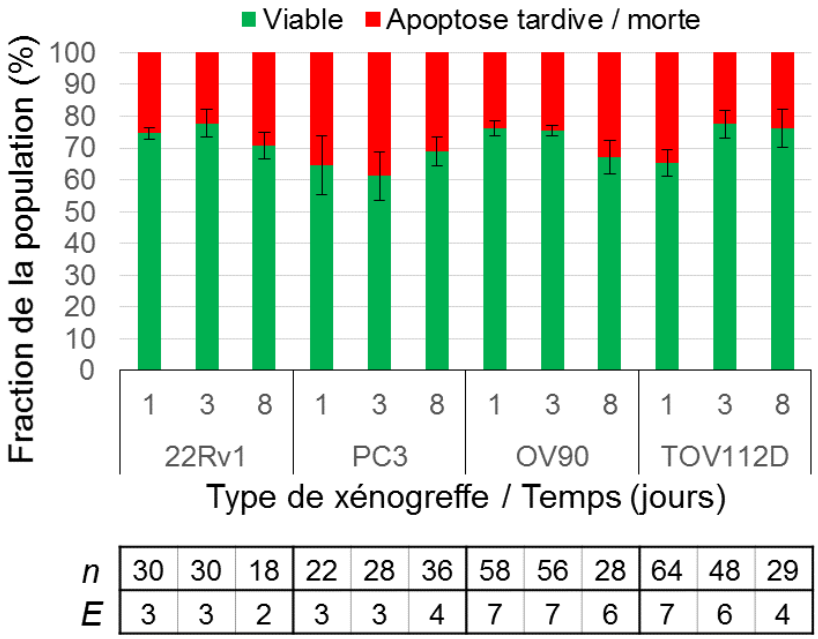
Une fois le protocole établi et le système microfluidique optimisé (voir section 4.1), trois techniques complémentaires d'analyse de viabilité ont été adaptées à notre procédure et utilisées pour mesurer la survie des TMD au sein de la plateforme : la microscopie confocale des cellules viables et mortes, la cytométrie en flux pour séparer les cellules composant les TMD selon leur stade de mortalité (viable, apoptose précoce, apoptose tardive) et la détection du marqueur de mortalité LDH dans les fractions de milieu extraites des systèmes. Ces trois techniques présentent des avantages et inconvénients qui leur sont propres, tel que détaillé à la section de discussion 5.1.3.

Tel que présenté à l'Annexe A, la procédure de coupe et d'incubation dans les plateformes microfluidiques a été adaptée à du tissu de foie de rat lors du stage dans le laboratoire de Dre Verpoorte, aux Pays-Bas. Cela a permis d'explorer plusieurs techniques d'analyse qui pourraient aussi s'avérer utiles pour l'étude du cancer. En plus de l'analyse de viabilité faite par la détection de la LDH sécrétée dans le milieu et par microscopie confocale des échantillons marqués, les tissus micro-disséqués de foie (TMDF) ont été imagés par microscopie à deux photons et leur métabolisme a été évalué grâce à la séparation et à la détection de molécules par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP).

3.3.1 Analyse de viabilité par microscopie confocale

La viabilité des échantillons a été évaluée en mesurant la fluorescence des cellules marquées avec des fluorophores de viabilité et de mortalité (CTG et PI, respectivement) par microscopie confocale. L'imagerie des échantillons s'est faite directement à travers la mince couche inférieure de la plateforme faite de PDMS transparent. Tel que détaillé à la section 4.2 du Chapitre 4, les pourcentages de viabilité et de mort cellulaire ont été trouvés par un algorithme d'analyse des séquences d'images, programmé pour trouver automatiquement le seuil à appliquer dans les deux canaux de fluorescence afin de distinguer le signal (provenant des cellules marquées) du bruit de fond et pour calculer le ratio de l'aire de chacun des deux signaux sur l'aire totale détectée.

La *Figure 3.4* présente l'évolution de la viabilité des échantillons sur huit jours d'incubation dans les plateformes. Ces résultats montrent que les TMD de xénogreffe demeurent très viables tout au long de l'expérience, avec des viabilités moyennes au-dessus de 60% pour tous les types de tissus analysés. De plus, aucune baisse significative de viabilité n'a été mesurée sur cette période d'analyse, ce qui semble indiquer que les microsystèmes n'affectent pas les échantillons et que les conditions de culture sont suffisantes pour maintenir le tissu en vie.



n	30	30	18	22	28	36	58	56	28	64	48	29
E	3	3	2	3	3	4	7	7	6	7	6	4

Figure 3.4: Compilation des résultats de viabilité des TMD de quatre types de xénogreffes de souris, mesurés par microscopie confocale sur une période de huit jours suivant la récolte. La fraction viable de la population a été mesurée comme le ratio de l'aire occupée par les cellules viables (marquées avec le CTG) sur l'aire totale occupée par toutes les cellules marquées tandis que la fraction morte a été mesurée comme le ratio de l'aire des cellules en apoptose tardive ou mortes (marquées avec le PI) sur l'aire totale. Un total de 447 TMD ont été analysées pour produire ce graphique. Chaque barre d'erreur indique ± l'erreur type de la moyenne d'au moins deux expériences indépendantes. Pour chaque barre représentée, n représente le nombre de TMD analysées et E le nombre d'expériences indépendantes effectuées avec des xénogreffes provenant de souris différentes. Les images ont été acquises conjointement par Jennifer Kendall-Dupont et l'auteure, puis ont été traitées et analysées par l'auteure.

3.3.2 Analyse de viabilité par cytométrie en flux

Toutes les données présentées dans cette sous-section ont été acquises par Dr Abdul Lateef. Pour valider les résultats de microscopie confocale, l'étude de viabilité a été faite en parallèle par cytométrie en flux après avoir marqué les TMD avec l'annexine V et la 7-AAD, puis dissocié le tissu en cellules individuelles. Les cellules non marquées ont été considérées viables, celles marquées avec l'annexine V, en apoptose précoce et celles marquées seulement à la 7-AAD ou doublement marquées, en apoptose tardive ou mortes. Tel que montré à la *Figure 3.5*, la viabilité

mesurée au premier jour était plus basse qu'aux jours subséquents d'analyse, en particulier pour les TMD de PC3 et de OV90. En raison de l'importante variabilité des résultats, cette tendance n'est toutefois pas significative au seuil alpha égal à 5%. Au premier jour après la récolte, les échantillons peuvent paraître moins viables, puisqu'ils ne se sont pas complètement rétablis de la procédure de découpe du jour précédent. Au fil du temps, les cellules viables prolifèrent alors que les cellules mortes disparaissent, soit parce qu'elles se désagrègent en petits fragments non détectables ou soit parce qu'elles sont relâchées du tissu. Néanmoins, cette technique d'analyse montre que les TMD regagnent en viabilité dès le jour 3 à partir duquel tous les types de tumeurs analysés ont une viabilité moyenne supérieure à 57%.

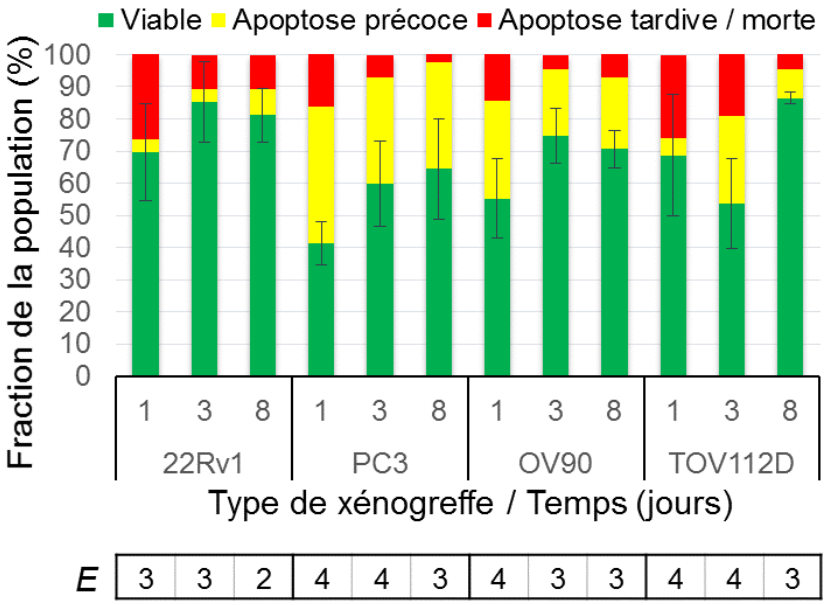


Figure 3.5: Compilation des résultats de viabilité des TMD de quatre types de xénogreffes de souris, mesurés par cytométrie en flux sur une période de huit jours suivant la récolte. Les cellules analysées ont été séparées en trois groupes : les cellules viables (non marquées), les cellules en apoptose précoce (marquées avec l'annexine V) et les cellules en apoptose tardive ou mortes (marquées avec l'annexine V et la 7-AAD, ou avec la 7-AAD seulement). Chaque barre d'erreur (sur la fraction viable de la population) représente ± l'erreur type de la moyenne d'au moins deux expériences indépendantes. E représente le nombre d'expériences indépendantes avec des xénogreffes de souris différentes effectuées pour chaque barre représentée. Toutes les données ont été acquises par le Dr Abdul Lateef, puis ont été compilées et interprétées par l'auteure.

De manière générale, les résultats de microscopie confocale concordent bien avec ceux de cytométrie, sauf au jour 1 pour les TMD de PC3 et de OV90. Notons que la cytométrie catégorise les cellules en trois groupes, tandis que la microscopie sépare la population en seulement deux groupes. La différence la plus marquée entre les résultats de cytométrie et ceux de microscopie confocale s'est produite pour les types de TMD ayant une plus grande proportion de cellules en apoptose précoce. En détectant les cellules en apoptose précoce en plus de celles en apoptose tardive, la méthode de cytométrie peut détecter les cellules en processus de mort sur un intervalle de temps plus long, dès l'initiation de l'apoptose jusqu'à la fragmentation de la cellule morte. En revanche, il est possible que les cellules en stade précoce d'apoptose puissent encore métaboliser le CTG et produire un signal de viabilité dans les échantillons de microscopie. Cette différence importante de marquage des échantillons peut expliquer en partie les différences entre les résultats des deux modalités d'analyse. Une étude plus exhaustive de la corrélation entre les deux techniques est présentée à la section 5.1.3.1.

3.3.3 Analyse de sécrétion du marqueur de mortalité LDH

La LDH sécrétée par les TMD est proportionnelle au nombre de cellules mortes. Elle a été mesurée dans les fractions de milieu collectées à la sortie des systèmes et normalisée à la quantité totale mesurée pour un même système au cours de toute la période d'analyse. Ainsi, le taux de mortalité des mêmes échantillons a pu être suivi dans le temps jusqu'au dernier jour d'analyse. Tel que montré à la *Figure 3.6*, les profils de sécrétion du marqueur de mortalité LDH sont similaires pour les quatre types de xénogreffes, avec un plus haut taux de mortalité au jour 1, puis des taux beaucoup plus faibles aux jours subséquents. Ceci indique qu'une importante proportion de cellules est morte pendant les 24 premières heures suivant la coupe, en particulier pour les TMD de PC3, ce qui concorde bien avec les résultats plus faibles de viabilité mesurés au jour 1 par cytométrie. Les échantillons ont vraisemblablement été affectés par la procédure de coupe et ont continué à mourir pendant le premier jour d'incubation. Aux jours subséquents, les faibles taux de mortalité corroborent les résultats des deux autres techniques d'analyse, soit que les TMD survivent à l'intérieur de la plateforme microfluidique, même sans perfusion. À la toute fin de la période d'incubation, les TMD ont été collectées et intentionnellement lysées pour libérer toute la LDH restante. De très hautes concentrations de LDH ont été mesurées dans ces échantillons finaux,

indiquant qu'une grande proportion des TMD était encore viable au terme de la période de huit jours.

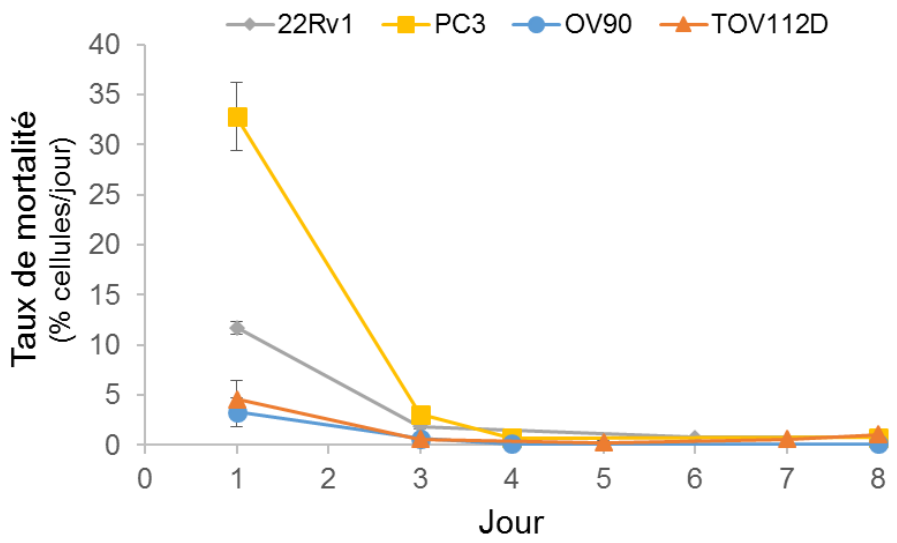


Figure 3.6: Taux de mortalité des TMD formées des quatre types de xénogreffes, mesurés comme des taux de sécrétion du biomarqueur de mortalité LDH sur une période de huit jours suivant la récolte. Les résultats sont corrigés pour la dégradation de l'enzyme pendant la période de conservation à 4°C et sont normalisés à la quantité totale de LDH mesurée pour un même système tout au long de l'expérience du jour 1 jusqu'au dernier jour d'analyse. Les barres d'erreur représentent ± l'écart-type sur la moyenne de trois systèmes indépendants d'une seule expérience.

Cette technique offre des résultats intéressants, mais a nécessité plusieurs étapes d'optimisation et comporte encore des limites. En effet, le sérum présent dans les échantillons contenait une quantité basale de LDH, produisant un signal de fond indésirable pouvant cacher la présence de faibles concentrations de LDH sécrétée par les TMD. En retirant un plus petit volume de milieu des microsystèmes (60 µL), des concentrations détectables de LDH sécrétée par les TMD ont été obtenues dans les fractions de milieu malgré le bruit de fond causé par le sérum. De plus, certaines composantes du milieu de culture telles que le pyruvate inhibaient la réaction de conversion qui produit le formazan rouge. Pour contrer cet effet, certains paramètres du test ont dû être modifiés par rapport à ce qui était suggéré par le manufacturier : augmentation du ratio volumique de réactif pour échantillon et hausse du temps et de la température de réaction. Enfin, après avoir réalisé que la LDH se dégradait significativement pendant la période de conservation à 4°C, le taux de dégradation de l'enzyme a été mesuré expérimentalement et un facteur de correction

a été appliqué aux mesures (*Figure 2.11*). Une solution alternative à ce problème de dégradation pourrait être d'ajouter un inhibiteur de protéases aux fractions de milieu une fois retirées des systèmes, puis de conserver les échantillons au réfrigérateur ou au congélateur jusqu'au moment de l'analyse.

Un autre élément important à considérer est la dégradation de l'enzyme LDH se produisant à l'intérieur des systèmes, avant même que les fractions de milieu soient prélevées. Vu que l'activité enzymatique est plus importante à température plus élevée, cette dégradation à 37°C est probablement plus importante encore que celle se produisant lors de la conservation à 4°C. Une étude de la dégradation de l'enzyme LDH dans du sang d'agneau montre que son temps de demi-vie se situe entre 7 et 48 heures, dépendamment de la forme de LDH (isoenzyme) étudiée [70]. Pour minimiser l'influence de cette dégradation sur les résultats dans les expériences futures, les fractions de milieu devraient être collectées à intervalles très réguliers et suffisamment rapprochés pour limiter la dégradation tout en s'assurant que les fractions collectées aient des concentrations détectables de LDH sécrétée.

Pour répondre à l'objectif 4, la viabilité de quatre différents types de TMD a été évaluée par trois méthodes d'analyse complémentaires sur une période de huit jours. Toutes les méthodes indiquent que les TMD étaient majoritairement viables dès le troisième jour d'incubation. Une comparaison complète des trois méthodes d'analyse est proposée à la section de discussion 5.1.3, incluant une corrélation des résultats de cytométrie en flux avec ceux de microscopie confocale.

3.4 Effets de chimiothérapies sur des TMD de tissu primaire de patients

Grâce à une étroite collaboration entre la Dre Mes-Masson et certains chirurgiens du centre hospitalier universitaire de l'Université de Montréal (CHUM), en particulier la Dre Diane Provencher et le Dr Fred Saad, la procédure a pu être testée à quelques reprises avec du tissu primaire extrait de patients consentants. Les différents morceaux de tissu tumoral ont été sectionnés en échantillons sous-millimétriques en suivant la même procédure précédemment optimisée. Les propriétés mécaniques (élasticité et dureté) du tissu paraissaient plus hétérogènes que pour le tissu de xénogreffe de souris, ce qui a réduit l'efficacité de la procédure de coupe. Néanmoins, les TMD

produites ont été chargées sans difficulté dans les systèmes microfluidiques où elles ont été cultivées pendant quelques jours.

Pour l'expérience montrée à la *Figure 3.7*, le tissu a été préparé avec succès le même jour que la chirurgie de la patiente atteinte d'un carcinome séreux de l'ovaire de haut grade. Au total, 25 TMD ont été produites et chargées dans cinq systèmes. Trois de ces systèmes ont été utilisés comme contrôles alors que les deux autres systèmes ont reçu un traitement de carboplatine à une concentration de 336 µM, correspondant à 25 fois la concentration inhibitrice médiane (CI50) de la lignée cellulaire OV90 cultivée *in vitro* en un tapis cellulaire 2D. Le traitement a été initié après une journée de culture, renouvelé la journée suivante, puis retiré à la troisième journée de culture (*Figure 3.7A*). Une période de récupération de cinq jours sans traitement a suivi. Seule la technique d'analyse de viabilité par microscopie confocale a été employée pour ces échantillons étant donné le petit nombre de TMD obtenues. Les mêmes échantillons ont été imagés au jour 3 et au jour 8, tant pour les échantillons traités que pour les échantillons contrôles.

Le tissu semble avoir répondu positivement au traitement, puisqu'une viabilité significativement plus faible (valeur-p égale à 0,03 obtenue en effectuant un test de Student non pairé) a été calculée pour les TMD traitées comparativement à celles non traitées au jour 3 (*Figure 3.7B*). Ces résultats sont prometteurs, puisque la patiente de qui provenait le tissu a reçu un traitement adjuvant de trois cycles de carboplatine-taxol et était en rémission sept mois après sa chirurgie cytoréductive. Toutefois, après la période de récupération de cinq jours, les TMD cultivées *in vitro* avaient une proportion de cellules viables comparable à celle des échantillons du groupe contrôle. Au cours de cette période, les cellules mortes ont probablement eu le temps d'être relâchées des TMD et de se fragmenter, de sorte que la plupart des cellules mortes présentes dans les puits au jour 3 (*Figure 3.7C*) sont absentes des puits au jour 8 (*Figure 3.7D*). Les cellules ayant survécu au court traitement de carboplatine appliqué dans les microsystèmes ont quant à elles proliféré et occupent une proportion importante des puits au huitième jour de culture.

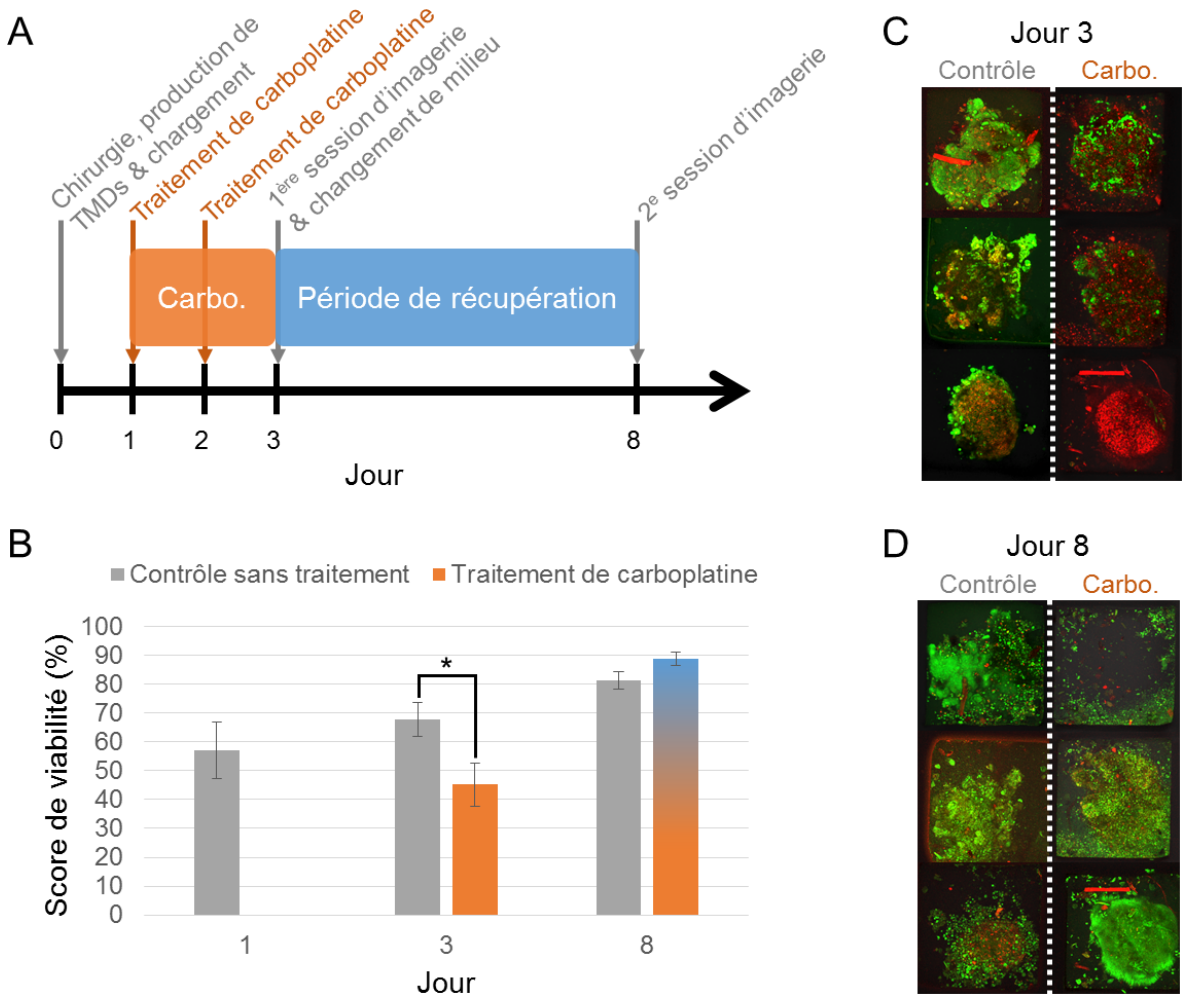


*Figure 3.7: Évaluation de l'effet de la carboplatine sur des TMD de tissu tumoral extrait d'une patiente atteinte du cancer de l'ovaire. A) Aperçu de la procédure de traitement des TMD avec de la carboplatine, incluant une période de traitement du jour 1 au jour 3 suivie d'une période de récupération sans traitement du jour 3 au jour 8. B) Scores de viabilité calculés à partir des séquences d'images acquises au microscope confocal pour les échantillons traités avec le carboplatine et pour les contrôles non traités. Les barres d'erreur représentent ± l'erreur type de la moyenne d'au moins cinq TMD individuelles d'une même condition. C) Projections maximales représentatives de séquences d'images acquises au microscope confocal des TMD du groupe contrôle et du groupe traité, immédiatement après la période de traitement avec le carboplatine, au jour 3. *différence significative (valeur-p = 0,03). D) Projections maximales pour les mêmes TMD des deux groupes (contrôle et traité) après les cinq jours de récupération, au jour 8.*

Il faut toutefois nuancer ces résultats en notant que des résultats significatifs ont été obtenus au jour 3 en incluant les résultats de neuf TMD par condition (certaines TMD ont été retirées de l'analyse à cause de problèmes de segmentation par l'algorithme d'analyse d'images). En raison de l'importante variabilité entre les résultats de TMD d'une même condition, un nombre plus faible de TMD n'aurait pas donné de résultat significatif au même seuil alpha égal à 5%. De plus, dans les situations où les mêmes échantillons sont marqués et imagés à deux reprises, il serait préférable d'employer des fluorophores différents pour les cellules viables afin que le signal de la deuxième lecture ne soit pas influencé par le signal résiduel de la première lecture.

En réponse au cinquième objectif de ce projet de maîtrise, un premier test de traitement appliqué directement sur du tissu cancéreux primaire d'une patiente a été accompli au sein de la plateforme microfluidique. Ce test semble très prometteur, puisqu'il a montré que du tissu humain peut être coupé en suivant la procédure décrite dans ce mémoire et cultivé à l'intérieur de la plateforme microfluidique développée. De plus, le tissu est demeuré viable dans le groupe contrôle tout au long de la période d'incubation sur huit jours. Tel que montré en utilisant du carboplatine dans cette expérience préliminaire, des traitements peuvent aussi être appliqués dans les canaux et leur effet sur la viabilité du tissu peut être mesuré par une analyse en microscopie confocale. Toutes ces étapes restent tout de même à valider avec un nombre plus important d'échantillons humains et en utilisant les deux autres techniques d'analyse mises au point dans le cadre de ce projet.

CHAPITRE 4 DÉVELOPPEMENT DES TECHNIQUES DE PIÉGEAGE ET D'ANALYSE D'IMAGES EN FLUORESCENCE

Deux étapes importantes de développement et d'optimisation qui n'ont pas été décrites dans les chapitres précédents sont détaillées ici. La première a trait au processus itératif ayant mené au design final de la plateforme microfluidique à piégeage par sédimentation décrite à la section 2.2 et caractérisée à la section 3.2. La seconde concerne l'algorithme de segmentation d'images fluorescentes développé pour analyser les séquences d'images acquises par microscopie confocale tout au long du projet.

4.1 Processus itératif de design de la plateforme microfluidique

La plateforme microfluidique a évolué au cours de l'avancement du projet. Des plateformes conçues par le passé ont d'abord été testées, puis un nouveau modèle a été proposé en incorporant les meilleurs aspects des designs précédents révélés à chaque étape du processus itératif.

4.1.1 Piégeage résistif

Dans un premier temps, les systèmes à piégeage résistif de Das *et al.* [30] ont été testés. Tel que montré à la *Figure 4.1*, ces systèmes sont composés d'un canal central (vert) avec des zones d'étranglement pour piéger les échantillons et d'un canal de contournement (blanc). Lorsqu'un sphéroïde ou une TMD arrive à l'intersection entre le canal central et la voie de contournement, il suit préférentiellement la voie de plus faible résistance hydraulique, soit vers le piège si celui-ci est vide, soit vers la voie de contournement lorsqu'un sphéroïde ou une TMD est déjà piégé. Effectivement, la présence d'un échantillon dans la zone d'étranglement augmente la résistance hydraulique du canal central (R_p) et le canal de contournement devient alors la voie de plus faible résistance. Le ratio de résistances entre le piège et le canal de contournement, R_p/R_c, doit être inférieur à un et suffisamment faible pour maintenir un taux de piégeage intéressant, mais aussi suffisamment élevé afin d'éviter que plusieurs échantillons se retrouvent dans le même piège. De plus, les dimensions de la zone d'étranglement doivent être assez petites pour empêcher la déformation et le passage de l'échantillon à travers le piège. Dans ce type de système, les pièges sont au même niveau que le canal de chargement.

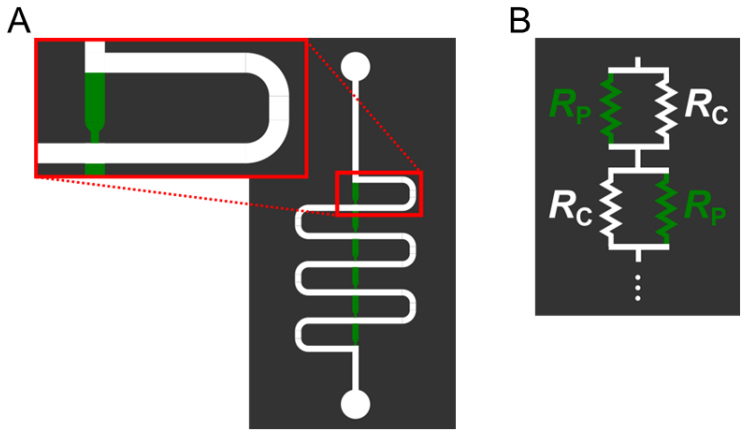


Figure 4.1: Mécanisme de piégeage résistif. A) Schéma d'un système à piégeage résistif avec vue agrandie sur un piège et une voie de contournement. Les pièges résistifs sont montrés le long du canal central en vert et la voie de contournement est montrée en blanc. B) Schéma électrique équivalent montré pour une succession de deux pièges : R_p correspond à la résistance hydraulique du piège et R_C correspond à la résistance hydraulique du canal de contournement.

Dans le cadre de ce projet, une version multiplexée du système montré à la *Figure 4.1* a été employée. Essentiellement, la largeur du canal central et la longueur des pièges ont été réduites dans la version multiplexée, afin d'augmenter le nombre d'échantillons piégés sur une seule lame de microscope. Au total, huit canaux comportant chacun huit pièges se trouvent sur une lame. Cette haute densité de canaux et de pièges rendait toutefois les systèmes difficiles à manipuler et à charger avec des échantillons. Des exemples de problèmes rencontrés sont répertoriés à la *Figure 4.2* incluant le chargement de plusieurs sphéroïdes dans un même piège, l'obstruction d'un canal par plusieurs sphéroïdes, le déplacement du sphéroïde lors de la manipulation de la plateforme, la difficulté à piéger des sphéroïdes légèrement plus larges et la déformation d'un sphéroïde traversant zone d'étranglement d'un piège. Les problèmes les plus incommodants ont été le déplacement des échantillons lors du transport des plateformes à cause du flux de refoulement de la sortie vers l'entrée se produisant à la moindre inclinaison des systèmes ainsi que la perte d'échantillons à travers la zone d'étranglement du piège, en particulier lors de la fragmentation de ceux-ci après l'application d'un traitement.

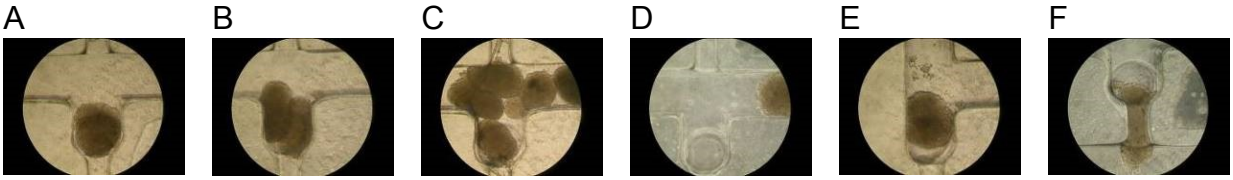


Figure 4.2: Problèmes de chargement et de manipulation des échantillons dans la plateforme multiplexée à piégeage résistif. A) Sphéroïde chargé correctement, B) deux sphéroïdes chargés dans le même piège, C) plusieurs sphéroïdes obstruant le canal principal, D) sphéroïde déplacé dû au flux de refoulement lors de la manipulation de la plateforme, E) sphéroïde trop large pour occuper le piège et F) sphéroïde déformé passant par la zone d'étranglement du piège.

4.1.2 Piégeage par sédimentation

Pour contrer plusieurs des difficultés rencontrées avec la plateforme à piégeage résistif, une nouvelle technique de piégeage a été étudiée. Les principales itérations de fabrication des systèmes à piégeage par sédimentation sont montrées à la *Figure 4.3*.

D'abord, le mécanisme de piégeage a été validé en utilisant le système à deux puits (design de Sina Fartoumi, *Figure 4.3A*), mais les pièges rectangulaires étaient trop larges, ce qui nuisait à la stabilité des échantillons et favorisait la formation de bulles. L'expulsion complète de l'air lors des étapes de préparation y était aussi ardue en raison des coins à angle droit ainsi que la rugosité canaux et des puits. De plus, les puits et les canaux étaient moulés dans des couches différentes de PDMS, ce qui ajoutait une étape d'alignement pouvant compromettre la qualité et la reproductibilité de l'assemblage. La *Figure 4.4A* montre un exemple d'un puits rectangulaire mal aligné avec le canal du dessus (représenté par les lignes verticales à gauche de l'image). Enfin, la hauteur des canaux n'était pas uniforme. La rugosité et la hauteur variable des canaux étaient provoquées par la méthode de fabrication du moule par photolithographie, mal adaptée à la fabrication de structures ayant des dimensions de plusieurs centaines de micromètres. La photolithographie est généralement utilisée pour fabriquer des structures beaucoup plus petites. Le micro-usinage assisté par ordinateur, employé par la suite pour la fabrication des moules, est mieux adapté avec un contrôle précis des dimensions autant sur l'axe de la hauteur que sur les deux autres axes. Le fini de surface peut aussi être raffiné, jusqu'à un degré acceptable, en modifiant les paramètres d'usinage. Le micro-usinage élimine donc les deux inconvénients rencontrés avec la photolithographie pour des structures aux dimensions près du millimètre.

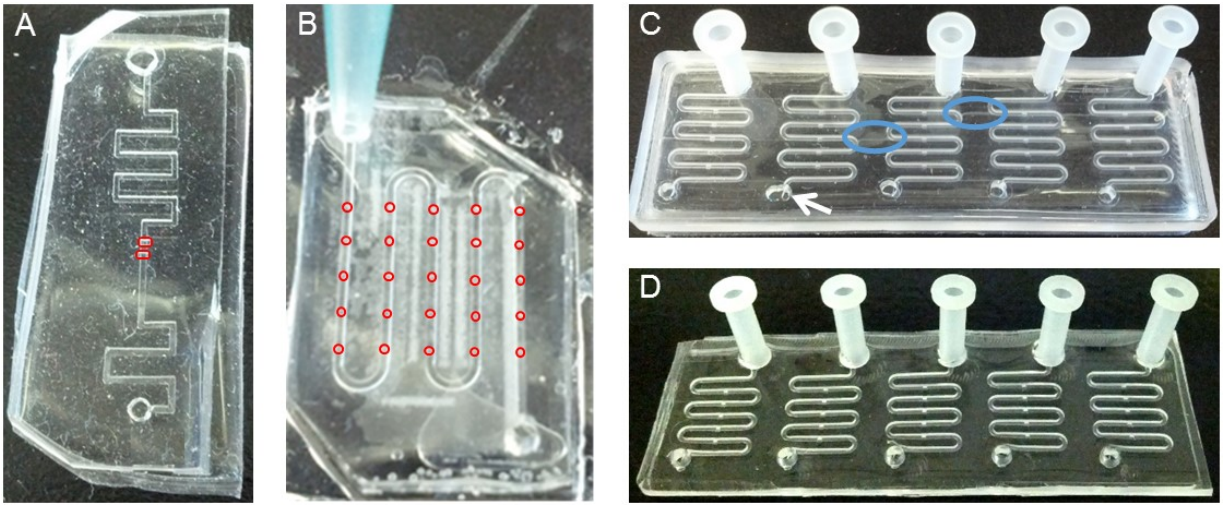


Figure 4.3: Évolution du design des microsystèmes à piégeage par sédimentation. A) Vue de haut d'un système unique avec deux pièges rectangulaires dont les contours sont rehaussés en rouge (design de Sina Fartoumi). B) Vue de haut d'un système unique avec 25 puits cylindriques dont les contours sont rehaussés en rouge (design de Simon Bolduc Beaudoin). C) Vue de haut inclinée d'une plateforme multiplexée à cinq systèmes, chacun comportant cinq puits à base carrée. Des défauts de fabrication sont montrés : connexions indésirables entre les systèmes (ovales bleus) et un trou de sortie de forme irrégulière (flèche blanche). D) Vue de haut inclinée d'une plateforme multiplexée à cinq systèmes avec résolution des problèmes soulignés en C (design de l'auteure).

La *Figure 4.4* montre qu'un fini beaucoup plus lisse des côtés du puits a été obtenu par micro-usinage (*B* et *C*) comparativement aux résultats de photolithographie (*A*). En plus, le micro-usinage nécessite une moins grande spécialisation du personnel qui n'a pas besoin d'apprendre les techniques de fabrication en salle blanche.

Ensuite, un système de 25 puits cylindriques de 500 µm de diamètre (design de Simon Bolduc Beaudoin, *Figure 4.3B*) a été testé. Les échantillons sédimentaient très lentement au sein de ce système en raison de la distance réduite entre les échantillons et le mur du puits. Tout comme la version précédente de plateforme à piégeage par sédimentation, celle-ci nécessitait aussi l'alignement des pièges avec le canal principal lors de l'assemblage. Les moules de ce système, les premiers à être fabriqués par micro-usinage, ont tout de même aidé à valider la pertinence de poursuivre avec cette méthode de fabrication vu le caractère lisse des canaux et le contrôle de la hauteur des structures. Avec une maîtrise plus grande de la machine-outil à commande numérique,

il a été possible de superposer les motifs des canaux et des pièges dans un même moule, éliminant le besoin d'aligner les pièges avec les canaux dans les prochaines itérations du design.

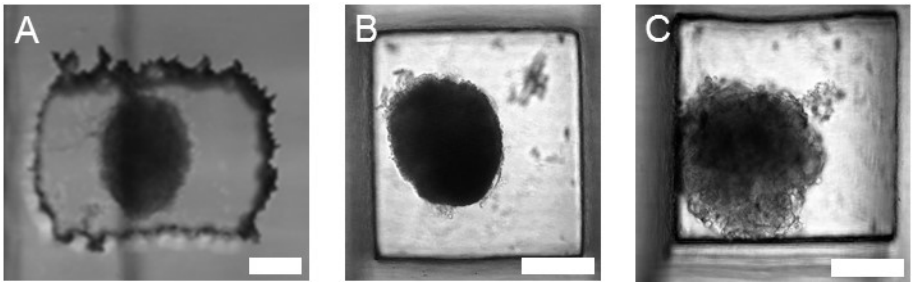


Figure 4.4: Comparaison du fini de surface des systèmes selon la méthode de fabrication du moule. A) Photographie d'un puits rectangulaire dont le moule a été fabriqué par photolithographie. B et C) Photographies de puits carrés dont le moule a été fabriqué par micro-usinage. Note : des TMD sont piégées dans les puits. Barres d'échelle ≈ 200 µm.

Les tests initiaux avec les deux systèmes précédents montraient bien que les puits cylindriques ralentissaient trop le processus de sédimentation des TMD alors que les puits rectangulaires piégeaient les échantillons à un rythme plus raisonnable. Toutefois, les dimensions optimales des pièges restaient à être identifiées. Le prochain système (design de l'auteure, non illustré) était composé de cinq pièges rectangulaires ayant une hauteur de 500 µm, une largeur de 500 µm et une longueur allant de 500 à 700 µm à intervalles de 50 µm. Le piège de 600 µm de long offrait le meilleur compromis entre vitesse de sédimentation et stabilité des TMD.

Dans le système suivant (design de l'auteure, *Figure 4.3C*), la section transverse du canal principal a été augmentée à 600 µm pour faciliter la circulation des échantillons jusqu'aux pièges. Les dimensions finales des pièges étaient donc de 600 µm de long, 600 µm de large et 500 µm de profond. Un microréservoir (*Figure 2.2*) a aussi été créé dans l'entrée pour faciliter le chargement des échantillons dans le canal. Ce système offrait une bonne performance pour piéger les échantillons et les maintenir en place tout au long de la période d'incubation, mais certains défauts de fabrication demeuraient, tels que soulignés à la *Figure 4.3C*. Des connexions indésirables se produisaient entre les canaux des différents systèmes d'une même plateforme au moment de l'assemblage. Aussi, les trous d'entrée et de sortie avaient des dimensions et positions variables puisqu'ils étaient percés manuellement dans une couche de PDMS vierge pour former le haut de la plateforme. Ces problèmes ont été résolus dans le design final (*Figure 4.3D*) : premièrement, en

modifiant le parcours de la fraise de surfaçage de la machine-outil afin d'empêcher que d'éventuels défauts de fabrication ne compromettent l'étanchéité des canaux et deuxièmement, en fabriquant un moule pour la couche supérieure de PDMS afin d'assurer la reproductibilité de la position et de la taille des trous d'entrée et de sortie. Ces dernières modifications ont simplifié et accéléré la procédure de fabrication tout en facilitant la manipulation des plateformes par les utilisateurs finaux.

Une amélioration continue de la plateforme microfluidique a permis l'adoption d'un design final qui a bien répondu aux besoins de ce projet de maîtrise et qui continue à être utilisé à ce jour par l'équipe du CRCHUM.

4.2 Algorithme de segmentation d'images fluorescentes

L'algorithme de segmentation d'images fluorescentes a été développé pour calculer la viabilité des TMD. Par le passé, pour l'analyse de viabilité de sphéroïdes à partir de séquences d'images acquises au microscope confocal, un algorithme de compte automatique combiné au compte manuel des cellules viables et mortes avait été utilisé. Cependant, cette méthode n'a pas pu être employée pour l'analyse des TMD, puisqu'il était souvent difficile de distinguer les cellules individuelles marquées formant le tissu. De plus, une telle approche semi-automatisée aurait demandé beaucoup de temps vu le nombre d'échantillons analysés. L'approche retenue a plutôt été de calculer l'aire relative du signal provenant des cellules viables par rapport à toutes les cellules viables et mortes détectées. Tel que décrit à la section 4.2.1, cela a nécessité l'exécution de quelques opérations sur les images, pour s'assurer de détecter la majorité du signal présent sans toutefois le sur-segmenter. L'algorithme développé comporte tout de même certaines limites, qui sont discutées à la section 4.2.2.

4.2.1 Performance de l'algorithme

L'algorithme devait être conçu de manière à minimiser l'intervention de l'usager lors de la détermination des seuils de segmentation, tout en maintenant une vitesse d'exécution acceptable. L'algorithme effectue une segmentation automatique des images, sans aucune intervention de l'usager, mais une vérification finale est nécessaire pour s'assurer qu'aucun problème ne soit survenu. En moyenne, le temps d'exécution de l'algorithme pour une séquence d'images complète est d'environ 3,5 secondes (exécuté avec un ordinateur muni d'un processeur Intel® Core™

i7-4500U à 1,8 GHz et de 16 GB de mémoire vive), considérant des séquences de 18 tranches optiques acquises pour les deux canaux de fluorescence à une résolution de 512 par 512 pixels.

L'algorithme est composé de quatre modules principaux incluant le débruitage, l'égalisation, la détection des contours et la segmentation du signal. La pertinence de chacun d'eux est détaillée et des exemples concrets d'application sont donnés dans les sections ci-dessous.

4.2.1.1 Module de débruitage

Pour raccourcir le temps d'acquisition, les images ont été acquises rapidement (400 lignes par seconde) et avec une résolution moyenne de 512 x 512 pixels. Pour éviter d'endommager les échantillons ou de photoblanchir les fluorophores, l'intensité des lasers a été maintenue basse alors que le gain des photomultiplicateurs (PMT) était généralement élevé. Vu le faible nombre de photons atteignant les détecteurs en microscopie confocale, phénomène amplifié par la vitesse rapide d'acquisition dans nos expériences, il en résulte des images légèrement dégradées par du bruit de Schottky (en anglais, *shot noise*). Ce type de bruit est dû à la variation statistique, suivant une loi de Poisson, du nombre de photons pouvant être détecté pendant un intervalle de temps donné. D'autres sources de bruit peuvent avoir affecté le signal, tels que des fluctuations dans l'intensité du laser ou du bruit électronique dans l'instrumentation [71].

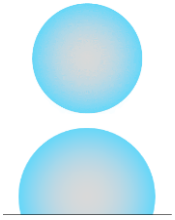
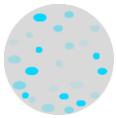
Ce module a donc été créé pour éviter que les étapes subséquentes de l'algorithme ne soient trop affectées par le bruit présent dans les images. Un simple filtre médian, de taille 3 x 3, a été employé dans toutes les images. L'intensité de chacun des pixels a ainsi été ramenée à la médiane de l'intensité de son voisinage de neuf pixels (incluant le pixel d'intérêt), ce qui a pour effet d'atténuer les variations d'intensité causées par le bruit sans toutefois rendre les contours des zones marquées trop flous. Pour minimiser la perte de signal due à cette opération de débruitage, le filtre n'a pas pu être grossi davantage sachant que les groupes de pixels de moins de la moitié de l'aire totale du filtre seraient perdus par cette opération. [72]

4.2.1.2 Module d'égalisation du signal

Les séquences d'images acquises présentaient des zones marquées d'intensités variables à cause des effets énumérés dans le *Tableau 4.1* qui s'additionnent les uns aux autres. L'effet de diminution de l'intensité selon la profondeur du plan d'imagerie dans le tissu, causé par la tridimensionnalité de celui-ci, aurait théoriquement pu être corrigé en connaissant exactement la

géométrie des échantillons. Par exemple, en considérant des échantillons cylindriques, l'intensité d'excitation aurait pu être augmentée avec la profondeur d'imagerie pour compenser l'absorption de la lumière par le tissu. En pratique, cela aurait été difficile à implémenter puisque la forme des échantillons varie et s'apparente souvent d'avantage à une sphère déformée qu'à un cylindre. En plus, cela aurait nécessité le réglage de paramètres additionnels par l'utilisateur pour chaque TMD imagée. Des imperfections d'exécution auraient nécessairement causé d'autres variations d'intensité, alors cette approche a été rejetée dès le départ. La diffusion limitée des marqueurs à travers le tissu 3D ne peut pas être complètement éliminée non plus. L'intensité variable d'une cellule à une autre est attribuable à une cause biologique qui ne peut pas être corrigée, à moins d'adopter une autre approche de marquage. Par exemple, toutes les cellules pourraient être marquées avec le marqueur DAPI ou DRAQ5™ qui traversent les membranes intactes pour marquer l'ADN des cellules viables et des cellules mortes alors que les cellules mortes pourraient en plus être marquées par le PI ou par un autre marqueur équivalent. Puisque l'intensité de ces agents intercalant d'ADN ne dépend pas du métabolisme de la cellule, l'intensité du signal serait moins variable d'une cellule à une autre. Le marquage au CTG présente toutefois l'avantage de marquer spécifiquement les cellules viables. Ce marqueur est d'autant plus intéressant grâce à sa non-toxicité et sa disponibilité dans plusieurs couleurs différentes, ce qui pourrait permettre d'effectuer deux lectures de viabilité sur les mêmes TMD à des temps différents.

Tableau 4.1: Causes possibles de variation d'intensité des cellules marquées et description de leurs effets

Causes	**Effets**	
Absorption et diffusion de la lumière par le tissu 3D	• Diminution de l'intensité détectée selon la profondeur du plan d'imagerie dans le tissu	
Diffusion limitée des marqueurs à travers le tissu 3D	• Diminution de l'intensité de marquage selon la distance entre la surface du tissu et le point imagé • Diminution de l'intensité de marquage sur la face d'un échantillon ayant adhéré à un côté du piège	
Variation du métabolisme entre différentes cellules viables	• Intensité de marquage variable d'une cellule à une autre, en particulier pour le CTG	

Vu l'impossibilité de corriger les variations d'intensité observées dans les images au moment de l'acquisition, ce module de l'algorithme a été créé pour équilibrer le signal dans chacun des canaux, afin que tous les pixels à segmenter soient d'intensités similaires. L'approche choisie consiste à multiplier l'image par l'inverse de la version floutée d'elle-même, obtenue en appliquant un filtre moyenneur à symétrie circulaire ayant six pixels de rayon. Cela rehausse les zones d'intensité plus faible, tel que montré à la *Figure 4.5*. Les zones saturées de signal retombent toutefois à 0, mais les pixels associés sont tout de même segmentés grâce aux deux seuils employés dans le module de segmentation (section 4.2.1.4).

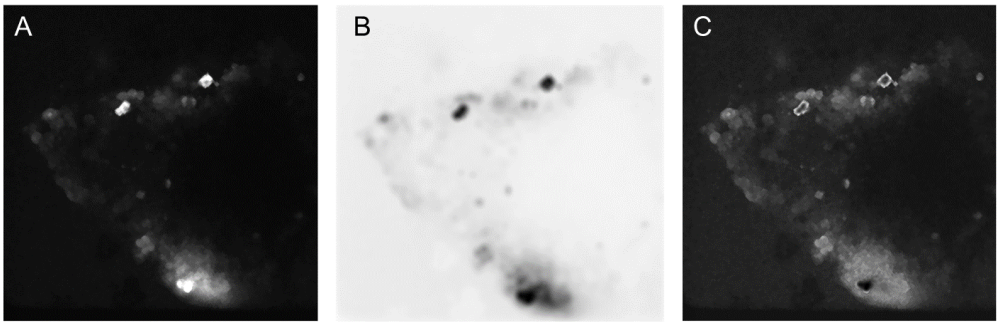


Figure 4.5: Exemple d'exécution du module d'égalisation appliqué au signal vert d'une TMD. A) Signal vert d'une tranche optique de TMD. B) Version floutée et inversée de l'image en A. C) Résultat de la multiplication de l'image en A par l'image en B.

4.2.1.3 Module de détection des contours

Ce module a été créé pour augmenter la contribution du signal provenant des cellules marquées aux valeurs prises en compte par la méthode d'Otsu pour déterminer le seuil d'intensité segmentation. Cela est particulièrement important en présence de bruit de fond élevé. Dans une telle situation, le nombre de pixels correspondant au signal à segmenter peut devenir moins significatif comparativement aux nombreux pixels correspondant au bruit de fond, empêchant l'algorithme de fonctionner comme il se devrait. Un exemple est montré à la *Figure 4.6*. On remarque d'abord que l'image à segmenter comporte un bruit de fond élevé, même après avoir été débruitée (*Figure 4.6A*). La méthode d'Otsu appliquée directement à l'image égalisée donne un résultat largement insatisfaisant : pratiquement tout le signal de fond a été segmenté (*Figure 4.6B*). Cela est en partie attribuable au fait que le signal de fond se trouve légèrement amplifié lors de l'étape d'égalisation du signal. Effectivement, lorsque la méthode d'Otsu est appliquée à l'image originale, après débruitage et sans égalisation du signal, le résultat de segmentation est

sensiblement meilleur dans ce cas-ci (*Figure 4.6C*). Malgré tout, le seuil trouvé a été trop bas, ce qui a causé la segmentation d'une partie du bruit de fond et la sur-segmentation des pourtours des zones marquées. En appliquant l'algorithme développé, qui trouve d'abord les contours du signal égalisé (*Figure 4.6D*) en appliquant un filtre laplacien [72], puis effectue le calcul de seuil par la méthode d'Otsu seulement aux pixels correspondant à des contours, le résultat est bien plus représentatif du signal observé (*Figure 4.6E*). Les contours ont été bien délimités et très peu de bruit de fond a été segmenté.

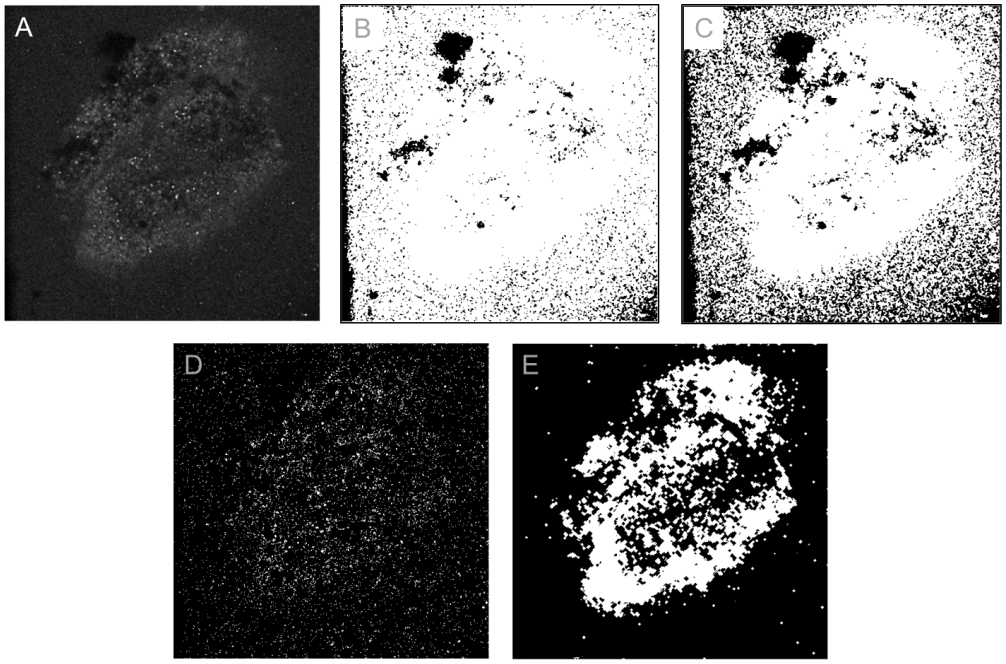


Figure 4.6: Exemple d'exécution du module de détection des contours appliqué au signal vert d'une TMD. A) Signal vert filtré et égalisé d'une tranche optique de TMD. B) Résultat de segmentation suivant la méthode d'Otsu appliquée directement à l'image en A. C) Résultat de segmentation suivant la méthode d'Otsu appliquée directement à l'image originale, après débruitage mais sans égalisation du signal. D) Résultat de la détection de contours réalisée en appliquant un filtre laplacien sur l'image en A, puis en retenant les pixels dont la valeur est supérieure au 95e percentile de l'intensité des pixels de l'image résultante. E) Résultat de segmentation suivant la méthode d'Otsu appliquée seulement aux valeurs de l'image en A correspondant aux contours détectés en D; le seuil trouvé étant appliqué à toute l'image en A. Bordures ajoutées pour fins de clarté.

4.2.1.4 Module de segmentation

Dans chacune des séquences d'images, deux seuils sont employés pour chaque couleur de signal fluorescent. L'un des seuils est simplement fixé à 75% de la valeur de saturation, soit à 191 pour une image ayant 256 niveaux de gris. L'autre seuil est trouvé par la méthode d'Otsu appliquée seulement aux pixels sur les contours des zones marquées, tel que détaillé à la section 4.2.1.3. La méthode d'Otsu suppose que deux groupes de pixels composent l'image : celui du signal à segmenter et celui du signal de fond. La méthode cherche la valeur de seuil qui sépare les pixels en deux classes en fonction de leur intensité et qui maximise la variance inter-classe, ce qui revient à minimiser la variance au sein de chaque classe. Le premier seuil est appliqué directement à l'image originale alors que le deuxième est appliqué à l'image égalisée. Les zones ainsi segmentées sont unies, puis l'aire est calculée pour le signal vert et le signal rouge afin d'effectuer le calcul final de viabilité.

Tel que montré à la *Figure 4.7*, l'algorithme développé permet de détecter les zones d'intensité plus faible qui ne sont pas détectées en appliquant la méthode d'Otsu seule. L'image représente une tranche optique de TMD qui a été prise à une profondeur de 40 µm dans le tissu, où certaines zones au centre de l'échantillon deviennent à peine visibles ou ne peuvent plus être imagées à cause de l'absorption et de la diffusion de la lumière par l'échantillon et du marquage supposé plus faible dans cette région. D'autres groupes de cellules sur le pourtour de l'échantillon ont visiblement métabolisé la molécule de CTG davantage et apparaissent beaucoup plus intenses. Autant les zones très intenses que les cellules apparaissant moins intenses ont été détectées dans les deux canaux de fluorescence, ce qui montre que l'algorithme réussit à compenser, jusqu'à un certain degré, les causes de variation d'intensité de signal énumérées au *Tableau 4.1*.

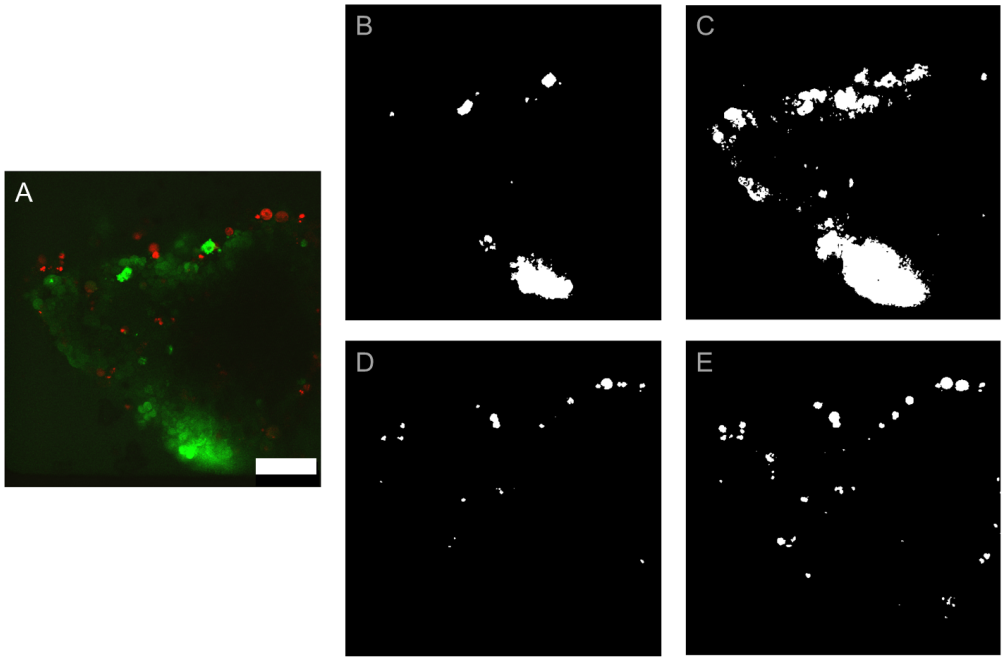


Figure 4.7: Exemple d'exécution de l'algorithme de segmentation sur les signaux vert et rouge d'une TMD. A) Superposition des signaux vert et rouge d'une tranche optique de TMD. B) Résultat de segmentation du signal vert suivant la méthode d'Otsu appliquée directement à l'image en A, après débruitage mais sans égalisation du signal. C) Résultat de segmentation du signal vert utilisant l'algorithme développé. D) Résultat de segmentation du signal rouge suivant la méthode d'Otsu appliquée directement à l'image en A, après débruitage mais sans égalisation du signal. E) Résultat de segmentation du signal rouge utilisant l'algorithme développé.

4.2.2 Limites de l'algorithme

Malgré une performance acceptable dans une grande majorité (plus de 90%) des images, l'algorithme comporte certaines limites. D'abord, l'algorithme calcule la viabilité en mesurant un ratio de l'aire des cellules viables sur l'aire totale détectée, mais ne corrige pas pour les différences d'aires qui pourraient exister entre les cellules viables et les cellules mortes résultant du choix des fluorophores. Aussi, l'algorithme a moins bien performé pour certaines séquences d'images, généralement en raison d'un signal de fond vert trop élevé ou d'un mauvais marquage du tissu.

4.2.2.1 Calcul de viabilité

Le calcul de viabilité effectué par l'algorithme suppose qu'une cellule morte et une cellule viable émettent un signal fluorescent d'aires similaires. Les marqueurs utilisés dans nos expériences ne garantissent pas la satisfaction de cette condition, ce qui constitue une limite à la procédure développée.

La totalité du cytoplasme des cellules viables devrait être marquée par le CTG tandis que surtout le noyau des cellules mortes devrait être marqué par le PI. Le PI pourrait aussi marquer le cytoplasme des cellules si elles contiennent beaucoup d'ARN [73]. On s'attend quand même à ce qu'en moyenne, une plus petite aire soit détectée pour les cellules mortes. L'algorithme, puisqu'il ne corrige pas pour cette différence d'aire dans son état actuel, pourrait surestimer la viabilité des échantillons. Cependant, lors de la comparaison avec les résultats de cytométrie en flux pour des échantillons d'une même expérience traités de façon identique et analysés au même moment, les résultats de viabilité trouvés par l'algorithme ont été surestimés 17 fois, sous-estimés 20 fois et estimés correctement à moins de 5% de différence 10 fois. La moyenne des différences de pourcentage de viabilité a été seulement légèrement supérieure à 0, avec une valeur d'environ 3%. Cela laisse croire que la méthode de microscopie confocale combinée à la segmentation automatique par l'algorithme ne surestime pas beaucoup la viabilité.

Puisque l'aire différentielle du noyau comparé à la cellule complète varie d'un type de cellule à un autre, la façon la plus directe de corriger cette erreur serait d'employer des fluorophores de viabilité et de mortalité qui marquent tous les deux la même portion des cellules, soit le noyau ou le cytoplasme. La combinaison DRAQ5™ et TO-PRO®-3, qui marquent spécifiquement l'ADN de toutes les cellules et des cellules mortes, respectivement, serait intéressante à tester mais ne permettrait de mesurer la viabilité qu'une seule fois sur les échantillons, puisque que DRAQ5™ s'intercale dans l'ADN des cellules viables et risque de perturber leur fonctionnement normal. Une autre alternative serait d'utiliser le CTG pour marquer les cellules viables en combinaison avec un fluorophore qui marque le cytoplasme des cellules mortes, tel que le marqueur *LIVE/DEAD® Fixable Far Red Dead Cell Stain*. En plus, cette procédure permettrait de marquer les cellules à une deuxième reprise utilisant un marqueur CellTracker™ d'une couleur différente, orange par exemple.

Ainsi, le problème de différence d'aire entre une cellule viable et une cellule morte, qui entraîne peut-être une légère surestimation de la viabilité par l'algorithme, pourrait être réglé en choisissant des fluorophores différents qui marquent le même compartiment cellulaire.

4.2.2.2 Causes de rejet de séquences d'images

Des 809 séquences d'images traitées par l'algorithme, seulement 71 ont été rejetées de l'analyse, dont 36 en raison d'une segmentation jugée inefficace lors de la vérification par l'utilisateur. Le taux de succès de segmentation a donc atteint 95,6%. Les principales raisons de rejet et leur occurrence pour chacun des types de xénogreffe sont résumées dans le *Tableau 4.2*.

Tableau 4.2: Raisons de rejet de séquences d'images segmentées par l'algorithme en fonction du type de xénogreffe imagé

Catégorie de rejet	**Occurrence (%)**				
	Globale	22Rv1	PC3	OV90	TOV112D
Segmentation du signal de fond vert	4,20	0	0,58	9,12	3,63
Segmentation du signal de fond rouge	0,25	0,63	0	0	0,52
Signal faible dans les deux canaux	3,58	0	1,75	8,07	1,55
Présence d'une particule fluorescente indésirable	0,74	0,01	0	1,05	1,04
Toutes catégories	8,77	0,64	2,33	18,24	6,74

La principale raison de rejet a été la sur-segmentation du signal vert à cause d'un bruit de fond élevé. Toutefois, ceci ne s'est surtout produit que pour les xénogreffes de type OV90 et TOV112D, toutes deux formées de cellules de cancer de l'ovaire. Il semblerait que dans certaines situations, les membranes cellulaires des cellules cancéreuses deviennent perméables aux molécules fluorescentes produites suite au clivage des groupements acétate du CTG. Ceci provoquerait une dissipation des molécules fluorescentes dans le milieu environnant de la TMD, entraînant une diminution du contraste entre les cellules viables marquées et l'environnement. Dans ces circonstances, l'algorithme arrive plus difficilement à distinguer le signal des cellules de celui qui a été relâché dans le milieu, ce qui peut donner une lecture de viabilité faussée. Un exemple de sur-segmentation du signal vert est montré dans la *Figure 4.8*. Malgré la défaillance de l'algorithme développé, celui-ci performe tout de même mieux que la méthode d'Otsu appliquée seule.

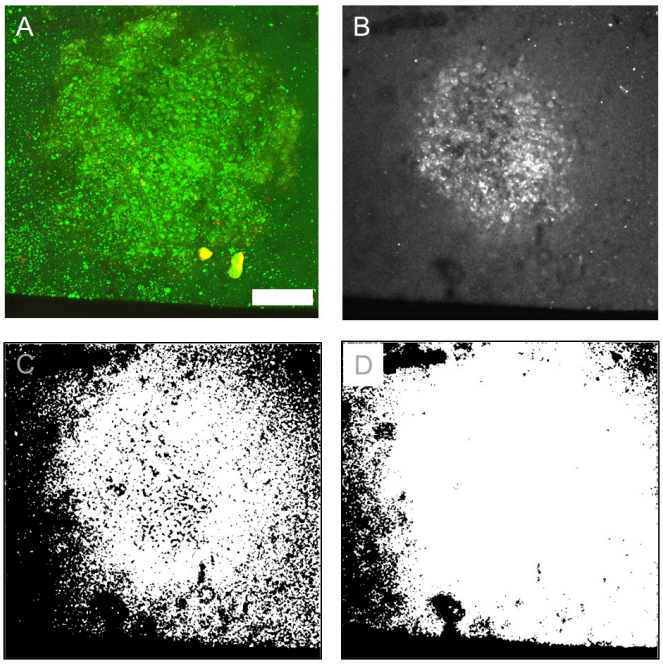


Figure 4.8: Exemple d'image avec bruit de fond vert élevé et segmentations erronées résultantes. A) Projection maximale de toutes les tranches optiques, barre d'échelle = 100 µm. B) Tranche optique à 20 µm de profondeur dans le tissu, canal vert. C) Segmentation résultante pour l'image montrée en B en utilisant l'algorithme développé. D) Segmentation résultante pour l'image montrée en B en utilisant la méthode d'Otsu non modifiée. Bordures ajoutées pour fins de clarté.

La sur-segmentation du signal rouge s'est aussi produite dans quelques cas. Toutefois, cette sur-segmentation n'a pas été causée par un signal de fond trop élevé. Effectivement, les précautions qui avaient été prises pour minimiser le signal de fond rouge, soit l'utilisation de milieu sans phénol rouge ainsi que le double rinçage des systèmes suite au marquage des échantillons avec les solutions de CTG et de PI, se sont avérées très efficaces. La sur-segmentation, dans ce cas, était plutôt due à une quasi-absence de signal dans le canal rouge à travers toute la séquence d'images. La méthode d'Otsu cherche tout de même à trouver le seuil qui sépare les pixels en deux groupes en fonction de leur intensité. Dans certains rares cas comme celui montré à la *Figure 4.9*, l'algorithme segmente un très faible signal résiduel se trouvant dans les puits microfluidiques ainsi qu'un bruit non perceptible dans les images. Pour éviter cette situation, une condition d'intensité minimale du 99,99^{e} percentile de l'image pourrait être ajoutée, par exemple, afin de vérifier qu'un véritable signal soit présent dans l'image avant de procéder à la segmentation. Ainsi, on accepterait de perdre le signal seulement si celui-ci représente moins de 0,01% de tous les pixels de la

séquence, ce qui correspond à moins de 400 pixels par séquence de 15 tranches optiques (de 512 par 512 pixels). La valeur précise du percentile ainsi que la valeur de l'intensité minimale pourraient être déterminées à l'aide de la banque d'images disponible, afin de s'assurer que l'algorithme suive son cours dès qu'un faible signal provenant des cellules marquées est présent dans la séquence.

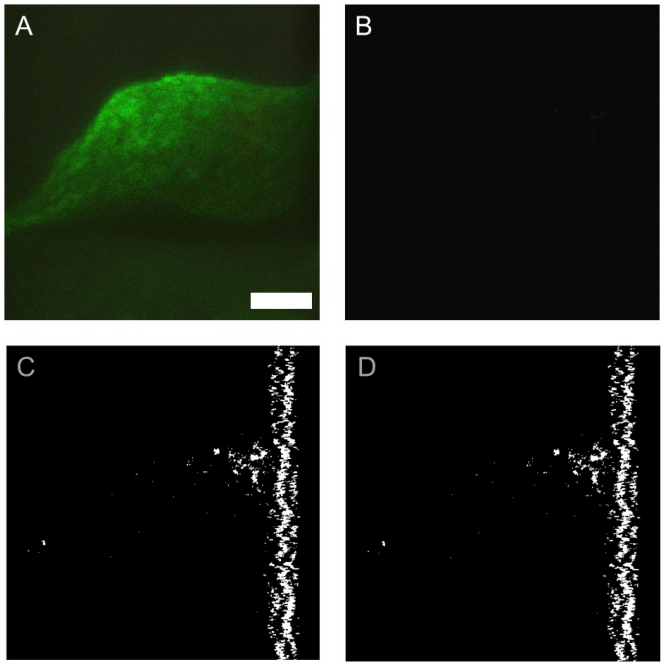


Figure 4.9: Exemple d'image où l'absence de signal rouge provoque une segmentation erronée. A) Projection maximale de toutes les tranches optiques, barre d'échelle = 100 µm. B) Tranche optique à 20 µm de profondeur dans le tissu, canal rouge. C) Segmentation résultante pour l'image montrée en B en utilisant l'algorithme développé. D) Segmentation résultante pour l'image montrée en B en utilisant la méthode d'Otsu non modifiée.

Les deux autres catégories de rejet recensées et illustrées à la *Figure 4.10* étaient dues à des problèmes expérimentaux, et non à des problèmes de segmentation par l'algorithme. Premièrement, certaines TMD paraissaient très faiblement marquées par les deux fluorophores. Bien que l'algorithme se soit comporté correctement pour ces images, le résultat n'a pas été conservé vu la faible proportion de cellules marquées. Le marquage de faible intensité se produit souvent lorsque les puits sont complètement remplis de cellules ou lorsque les TMD ont adhéré au fond du piège. Dans les deux cas, les cellules au fond du puits ont moins directement accès aux fluorophores qui doivent diffuser à travers le tissu pour atteindre certaines portions de celui-ci qui

se trouvent dans la zone imageable par microscopie confocale inversée. Néanmoins, cela n'a posé problème que dans environ 4% des séquences d'images. Deuxièmement, des particules fluorescentes ont été repérées dans les images à quelques reprises. Lorsqu'elles composaient plus d'environ 10% du signal, les images correspondantes ont été rejetées. Ces particules peuvent être des fragments de plastique provenant des embouts de pipette ou des poussières s'étant déposées dans l'entrée des systèmes lors de leur manipulation en dehors de la hotte biologique.

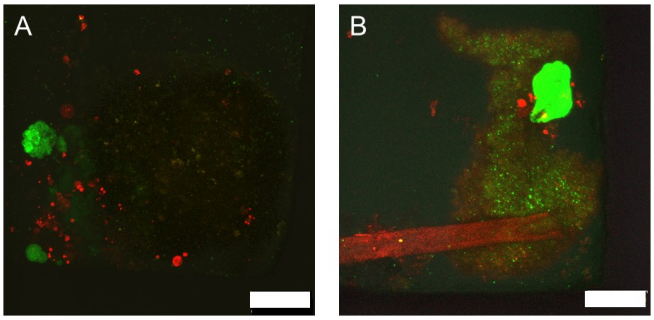


Figure 4.10: Autres exemples d'images rejetées de l'analyse.A) Projection maximale d'une TMD ayant une faible proportion de cellules marquées. B) Projection maximale d'une TMD piégée avec une particule fluorescente indésirable. Barres d'échelle = 100 µm.

Pour les deux xénogreffes du cancer de l'ovaire, OV90 et TOV112D, des taux de rejet plus élevés ont été répertoriés. Un bruit de fond vert élevé a été observé dans les séquences d'images, ce qui a affecté la performance de l'algorithme dans 6,9% des cas. En plus, pour la xénogreffe OV90, le marquage semblait très faible pour une proportion importante (8%) d'échantillons. Néanmoins, l'algorithme de viabilité a permis d'estimer la viabilité de manière plus quantitative et en tenant compte de l'ensemble de la séquence d'images acquise en microscopie confocale.

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette discussion vise à mettre les résultats des chapitres Chapitre 3 et Chapitre 4 en perspective, ainsi qu'à proposer des modifications aux méthodes employées qui pourraient être implémentées pour corriger certaines limites des techniques développées.

5.1 Synthèse des principaux résultats

5.1.1 Technique de découpe des tumeurs micro-disséquées

La technique de découpe du tissu en échantillons sous-millimétriques a été mise à l'épreuve en utilisant plusieurs types de tissus différents, incluant du tissu cancéreux provenant de xénogreffes de souris ou de tumeurs de patients (sections 3.1 et 3.4) et du tissu de foie de rat (Annexe A). Deux types de xénogreffes de cancer de prostate (22Rv1 et PC3) et deux types de xénogreffes de cancer de l'ovaire (OV90 et TOV112D) dont les résultats sont montrés dans ce mémoire ont été testés en plus de quatre autres types de xénogreffes utilisés dans le cadre d'autres projets[1] qui ont été subventionnés en partie grâce aux résultats initiaux de la présente étude. De plus, cinq échantillons de tumeurs humaines obtenues de patients (trois échantillons de tissu ovarien, deux de tissu prostatique) ont été préparés avec succès par l'équipe du CRCHUM en suivant la même procédure. Les TMD ainsi produites ont toutes été chargées avec succès dans les plateformes microfluidiques à piégeage par sédimentation. Les pertes de TMD pendant le chargement étaient négligeables. Dans une expérience typique effectuée avec une portion d'une seule xénogreffe de souris d'un volume d'environ 500 à 1000 mm^3, 250 TMD peuvent être produites et chargées dans 50 canaux indépendants en moins de six heures. Celles-ci peuvent ensuite être exposées à des conditions différentes ou utilisées pour effectuer des mesures par des techniques complémentaires d'analyse. Le nombre important d'analyses indépendantes pouvant être accomplies à partir d'une seule xénogreffe de souris a le potentiel de réduire le nombre d'animaux utilisés en recherche sur le cancer.

---

[1] CANADIAN UROLOGIC ONCOLOGY GROUP – ABBOTT LABORATORIES PROSTATE CANCER RESEARCH GRANTS: "Technical improvements in biopsy processing and microfluidics analysis in prostate cancer"; CCSRI - INNOVATION GRANT: "Microfluidic based empirical testing versus predictive biomarkers to stratify cancer care in ovarian cancer patients".

Depuis l'optimisation des techniques d'analyse, au cours de la dernière année, un grand total de 1160 systèmes indépendants (ou l'équivalent de 232 plateformes de la taille d'une lamelle de verre) ont été utilisés par l'équipe du CRCHUM et 6266 TMD ont été produites pour différentes expériences. Environ le tiers de ces échantillons a servi directement à produire les résultats présentés dans ce mémoire tandis que le reste a servi au développement parallèle de d'autres tests. Pour l'étude exhaustive de viabilité sur quatre types de xénogreffes montrée dans ce mémoire, 24 xénogreffes de souris ont été disséquées au total et analysées selon la méthode présentée. Ce grand nombre de répétitions permet d'assurer un niveau de confiance élevé quant à la robustesse de l'approche

La technique de découpe a permis de produire des TMD de tailles reproductibles, d'un diamètre moyen d'environ 380 µm. Cette taille est similaire à celle de sphéroïdes matures après quatre à sept jours de formation en gouttelettes suspendues [20], [30], ce qui devrait faciliter la transition entre les deux méthodes de culture. Ce diamètre est très près du diamètre maximal de 400 µm de la portion viable de tumeurs cylindriques non vascularisées mesuré dans des coupes histologiques de cancers du poumon [63]. Ce diamètre est aussi sensiblement inférieur au diamètre critique d'environ 450 µm trouvé grâce au calcul théorique simplifié de la distribution d'oxygène dans un échantillon de tissu cancéreux sphérique (section 3.2.4.1). Ces observations nous mènent à croire que le choix de taille des TMD produites est tout juste le bon pour leur permettre de survivre au sein des microsystèmes en l'absence de vascularisation interne du tissu et de perfusion. Autrement dit, l'échantillon est suffisamment massif pour contenir un grand nombre de cellules possédant une organisation tissulaire et pour imiter les gradients de nutriments se produisant naturellement dans les tissus *in vivo*, tout en étant assez petit pour survivre dans des conditions de transport passif de nutriments.

5.1.2 Comparaison des méthodes de piégeage des TMD

Deux types de piégeage des TMD ont été étudiés au cours du projet de maîtrise : le piégeage résistif et le piégeage par sédimentation. Par la première méthode, les échantillons se positionnent automatiquement dans des rétrécissements du canal central grâce à un ratio judicieusement choisi de résistances entre les pièges et le canal de contournement (voir la *Figure 4.1*). Par la deuxième méthode, les échantillons doivent être manuellement positionnés, à l'aide d'une micropipette servant à contrôler le débit, au-dessus des puits pour ensuite s'y piéger (voir la *Figure 2.2*). Le

piégeage par sédimentation, qui demande plus de manipulations de l'utilisateur, paraît tout de même supérieur au piégeage résistif pour deux raisons principales.

- Stabilité de piégeage : les échantillons piégés dans les puits microfluidiques restent généralement en place tout au long de l'expérience, peu importe dans quelle direction circule le milieu. Des débits élevés d'environ 800 µL/min doivent être induits dans le canal pour que les échantillons sortent de leur piège. Une légère inclinaison de la plateforme dans un sens comme dans l'autre ne peut donc pas provoquer l'éjection des échantillons, ce qui constitue une amélioration majeure comparativement aux systèmes résistifs pour lesquels un simple flux de refoulement provoqué par une légère perturbation de la plateforme pendant sa manipulation peut provoquer le déplacement et la perte des échantillons. Aussi, une plus grande certitude sur le positionnement des échantillons découle de cette caractéristique, ce qui facilite le suivi des mêmes échantillons dans le temps.
- Forces de cisaillement faibles : une fois piégées dans un puits, les TMD sont soumises à de très petites forces de cisaillement de l'ordre d'environ 2 dyne/cm^2 au maximum. Les risques que les échantillons se déforment ou se fragmentent sous ces forces sont donc réduits. Des échantillons structurellement fragilisés sous l'effet de chimiothérapies ont aussi moins de chances d'être perdus en raison de l'effet combiné de la stabilité de piégeage et des faibles forces de cisaillement.

Le désavantage principal du piégeage par sédimentation est le manque d'automatisation de la procédure de chargement. Une approche différente et intéressante à investiguer est le piégeage inertiel réalisé par Chung *et al.* [74] pour l'orientation et le piégeage d'embryons de drosophiles dont la taille est similaire aux TMD. Le chargement se fait à haut débit et permet de charger des centaines d'embryons dans un seul système en quelques minutes. La haute pression d'injection appliquée lors du chargement provoque une déformation du PDMS qui élargit l'entrée des pièges. Lorsque la pression est réduite, le PDMS reprend sa forme originale et les embryons se trouvent piégés. Ce mécanisme de verrouillage des échantillons pourrait être exploité dans une version améliorée des systèmes à piégeage résistif, par exemple. Toutefois, même si la méthode de piégeage développée par Chung *et al.* semble très attrayante à cause de la haute densité de piégeage qu'elle accomplit en peu de temps, elle ne répond pas bien aux besoins spécifiques de l'application visée ici pour laquelle les échantillons de tumeur doivent être chargés dans des systèmes différents

qui pourront être traités de manière indépendante avec des chimiothérapies. D'employer cette méthode de chargement avec de nombreux systèmes dans lesquels un petit nombre d'échantillons serait injecté est envisageable, mais semble contre-productif, puisqu'un certain temps devrait être investi à faire pénétrer les échantillons dans les canaux et à brancher chaque microsystème au générateur de pression. En outre, lors de la séance d'imagerie, il y aurait des pertes de temps à identifier dans quels pièges les échantillons auraient été capturés. En plus de nécessiter des instruments spécialisés pour générer une pression importante dans les systèmes, cette approche ne serait pas nécessairement plus rapide que celle de piégeage par sédimentation retenue.

Étant donné la grande simplicité du design choisi dans le cadre de ce projet, les plateformes sont extrêmement faciles à manufacturer et restent simples à opérer en employant des instruments (une micropipette et un stéréomicroscope) que les biologistes ont déjà l'habitude d'utiliser. Cela explique en partie pourquoi elles ont déjà été adoptées dans plusieurs sous-projets qui occupent, à l'heure actuelle, quatre chercheurs au CRCHUM.

5.1.3 Méthodes d'analyse de viabilité

Trois méthodes d'analyse de viabilité ont été testées en parallèle sur les échantillons de xénogreffe de souris. Le *Tableau 5.1* résume les avantages et désavantages des différentes méthodes relativement à notre application.

Tableau 5.1 : Avantages et désavantages des trois méthodes étudiées pour mesurer la viabilité des TMD

	Microscopie confocale	Cytométrie en flux	Marqueur de mortalité LDH
Avantages	+ Information sur : 1) La distribution spatiale 2) La morphologie + 1 mesure par TMD + Imagerie sur puce + Possibilité de ré-imager les mêmes échantillons + Automatisation possible	+ Analyse quantitative cellule par cellule + Détection de deux stades d'apoptose + Possibilité d'évaluer le stade du cycle cellulaire et la prolifération + Possibilité d'identifier différentes populations cellulaires	+ Plusieurs lectures du même système + Analyse des cellules détachées + Analyse quantitative
Désavantages	- Profondeur d'imagerie limitée à environ 40 µm - Cellule détachées non imagées - Autofluorescence	- Digestion des tissus avant l'analyse - Mesure moyennée sur tout un système - Haute concentration cellulaire nécessaire	- Mesure moyennée sur tout un système - Dégradation de LDH - Sensibilité du test à certaines substances du milieu

La microscopie confocale permet d'obtenir de l'information visuelle sur les échantillons analysés, comme la distribution spatiale de la viabilité et la morphologie des échantillons. Les TMD sont individuellement imagées par cette méthode, ce qui permet d'obtenir plusieurs mesures à partir d'un seul microsystème : la viabilité variable entre les régions de tumeur représentées par les différentes TMD se trouve donc mieux caractérisée. L'imagerie peut être faite directement à travers la plateforme microfluidique sans extraire ou perturber les échantillons, ce qui aide à standardiser la procédure et pourrait éventuellement faciliter son automatisation. Cependant, l'autofluorescence pourrait entraver l'utilisation massive de la technique si elle s'avère trop importante dans certains échantillons humains. Aussi, puisque la profondeur d'imagerie est limitée à environ 40 µm par cette méthode et puisque les cellules détachées et relâchées dans le canal ne sont pas considérées, la technique capture seulement la viabilité d'une portion de l'échantillon. En microscopie confocale inversée, cette portion correspond à la surface inférieure des TMD qui est la moins affectée par les chimiothérapies et qui a le moins accès aux fluorophores. Il en résulte parfois des échantillons faiblement marqués où il est difficile de détecter la mortalité induite par un traitement. Les échantillons pourraient éventuellement être imagés avec un microscope confocal droit à travers le haut de la plateforme, mais cela nécessiterait quelques adaptations au design actuel. Toutes ces

limites ont mené à l'évaluation d'autres techniques d'analyse de viabilité. Toutefois, la microscopie confocale et d'autres types de microscopie présentent un potentiel important d'automatisation qui justifie la poursuite de leur étude. Par ailleurs, même si cela n'a pas encore été testé avec nos échantillons, la microscopie offre le potentiel d'imager les mêmes TMD à plusieurs reprises. En choisissant bien les marqueurs fluorescents, deux mesures indépendantes de viabilité à des temps différents pourraient ainsi être effectuées. Cela permettrait d'améliorer grandement la puissance statistique de nos tests de traitement avec chimiothérapies, car les résultats générés avant et après traitement pourraient être pairés, rendant la variabilité inter-échantillons moins critique.

La cytométrie en flux pour la détection des stades d'apoptose offre quant à elle une analyse quantitative des cellules formant le tissu. En analysant les fractions de milieu récoltées des microsystèmes, les cellules détachées du tissu et sorties du piège sont aussi considérées. Toutes les cellules du tissu se trouvent donc représentées dans les bonnes proportions. En détectant deux stades d'apoptose (précoce et tardive) plutôt qu'une seule, le laps de temps pendant lequel un événement de mort cellulaire peut être détecté est plus grand. Cependant, la préparation du tissu pour la cytométrie nécessite plusieurs étapes qui seraient plus difficiles à automatiser : marquage, extraction des microsystèmes, dissociation pour libérer les cellules, puis tamisage pour conserver seulement les cellules individuelles. Ces étapes de préparation entraînent des pertes et pour obtenir un nombre intéressant de cellules, les cinq échantillons d'un système doivent être combinés pour l'analyse qui donne donc une mesure moyenne pour chaque système. Chaque groupe de cinq échantillons ne peut être analysé qu'une seule fois, éliminant donc la possibilité de pairer les résultats d'avant et d'après traitement. Néanmoins, la cytométrie en flux est une technique très polyvalente qui permettra d'examiner divers autres processus cellulaires utiles à l'étude du cancer, comme le cycle cellulaire et la prolifération. Aussi, en utilisant des marqueurs spécifiques à certains types de cellules, il serait possible d'évaluer les différentes sous-populations cellulaires représentées au sein des TMD.

La détection de l'enzyme LDH sécrétée dans le milieu par les cellules mourantes est une façon intéressante de suivre quantitativement l'état des mêmes échantillons dans le temps. Cette technique permet aussi, comme la cytométrie en flux, d'analyser l'ensemble des échantillons de tissu, incluant les cellules ayant pu se détacher et sortir des systèmes. Il est possible, toutefois, que toute la LDH sécrétée ne se retrouve pas dans les fractions de milieu extraites en raison de la dégradation de l'enzyme pendant l'incubation ainsi que de notre incapacité à prélever et à

renouveler complètement le milieu se trouvant dans les puits microfluidiques. En outre, nous avons trouvé que la sensibilité du kit de détection est affectée par certaines composantes du milieu. Alors chaque nouvelle substance devrait d'abord être testée pour s'assurer qu'il n'y ait pas d'interaction indésirable avec la réaction du kit de détection. La procédure de détection se fait pour l'instant dans une plaque à 96 puits et prend un temps considérable puisqu'elle demande beaucoup d'interventions de l'usager. Toutefois, une méthode permettant de mesurer continuellement la LDH ou un autre marqueur de mortalité dans le milieu sortant d'un système perfusé à faible débit pourrait être mise au point pour complètement automatiser la lecture de la mortalité des échantillons d'un système en limitant les problèmes de dégradation de la LDH.

5.1.3.1 Étude de corrélation entre les résultats de viabilité mesurés par microscopie confocale et par cytométrie en flux

Après avoir acquis tous les résultats de microscopie confocale et de cytométrie en flux, la corrélation entre les deux techniques a été évaluée. Pour ce faire, toutes les mesures de viabilité d'une même expérience faites par les deux techniques au même jour d'analyse ont été compilées dans le graphique montré à la *Figure 5.1A*. Des 47 résultats qui ont ainsi pu être comparés, une très faible corrélation avec un coefficient de Pearson égal à 0,10 a été trouvé. En retirant trois données aberrantes ayant une différence de viabilité supérieure à 50% entre les deux techniques, le coefficient de Pearson a augmenté à 0,33 (*Figure 5.1B*). Celui-ci représente toujours une corrélation faible, mais significative avec une valeur-p de 0,03 pour 44 points de comparaison.

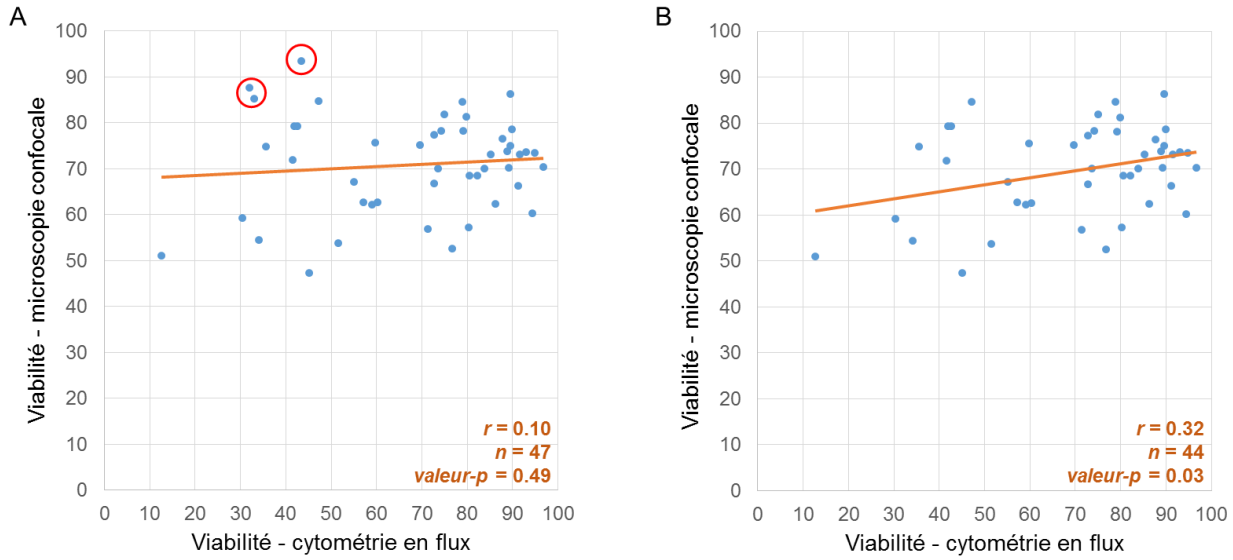


Figure 5.1: Graphique de corrélation entre les données de viabilité mesurées en microscopie confocale et en cytométrie en flux. A) Toutes les données de comparaison disponibles provenant de l'étude de survie sont représentées. B) Trois données aberrantes (encerclées en rouge) ont été retirées du graphique montré en A. r et n sont respectivement le coefficient de Pearson et le nombre de points considérés.

Cette faible corrélation et la tendance générale de la microscopie confocale à surestimer la viabilité pourraient être dues aux quelques différences importantes entre les techniques énumérées ci-dessous.

1- Portion des TMD analysée : pour la microscopie confocale, seule la couche inférieure est imagée jusqu'à une profondeur de 40 µm, représentant seulement 15% du tissu alors que pour la cytométrie, l'échantillon en entier est représenté. Des différences notables peuvent exister entre le haut et le bas des TMD en raison de l'asymétrie du système microfludique à piégeage par sédimentation. En effet, le haut des TMD a plus directement accès aux nutriments, aux traitements et aux fluorophores apportés par le canal.

2- Inclusion/exclusion des cellules détachées : les cellules détachées du tissu et perdues lors des lavages ne sont pas incluses dans l'analyse en microscopie confocale alors qu'elles le sont en cytométrie. Ces cellules peuvent représenter une portion importante du tissu, en particulier lorsqu'il est exposé à des traitements qui peuvent entraîner sa fragmentation.

3- Stades d'apoptose détectés : la microscopie confocale catégorise les cellules en deux groupes, les cellules viables et les cellules en apoptose tardive ou mortes, tandis que la cytométrie ajoute une troisième catégorie, soit les cellules en apoptose précoce. Il est impossible de prédire dans laquelle des deux catégories de microscopie confocale se trouvent les cellules en apoptose précoce. Il serait possible, par exemple, que certaines cellules en apoptose précoce soient marquées au CTG pour la microscopie ou encore qu'elles ne soient pas marquées du tout. Dans ces cas, l'analyse par microscopie confocale surestimerait une fois encore la viabilité des échantillons comparativement à la cytométrie.

4- Dénombrement des cellules : en cytométrie, les cellules sont comptées une à une lorsqu'elles passent devant le détecteur. Toutefois, avec la technique de microscopie confocale mise au point, nous supposons que le signal d'une cellule viable et celui d'une cellule morte occupent en moyenne des superficies égales dans les images et donc que le calcul de l'aire des signaux constitue une bonne approximation de la proportion des cellules dans chacun des groupes. Cette hypothèse n'est pas valide si le cytoplasme des cellules mortes n'est pas détecté ou si le faible signal d'autofluorescence du tissu est capté par l'algorithme.

En observant le graphique de corrélation à la *Figure 5.1B*, on constate qu'il n'y a pratiquement aucun point plus bas que 50% de viabilité en microscopie confocale et très peu de points en bas de 40% de viabilité en cytométrie en flux. La corrélation entre les deux techniques serait grandement améliorée si des points étaient ajoutés au graphique dans cette zone de faible viabilité. Des tests ont donc été menés par l'équipe du CRCHUM visant à produire des échantillons peu viables. Les échantillons ont été gelés ou traités avec des doses très élevées de chimiothérapies. Dans certains cas, des viabilités très faibles ont été mesurées en cytométrie, mais cela ne s'est traduit qu'une seule fois sur cinq en une viabilité inférieure à 50% mesurée en microscopie confocale. En considérant ces derniers résultats et toujours en retirant les trois données aberrantes, le coefficient de Pearson augmente très légèrement à 0,34 et reste significatif avec une valeur-p de 0,01 pour un total de 52 comparaisons (*Figure 5.2*).

Les résultats de cette section semblent indiquer que la plage dynamique de la microscopie confocale est très limitée, allant d'environ 60% pour les échantillons de faible viabilité à 74% pour

les échantillons à haute viabilité en se fiant à la courbe de régression linéaire de la *Figure 5.2*. Des modifications à l'algorithme de segmentation des images pourraient aider à améliorer la situation, mais les limites expérimentales énumérées ci-dessus sont tout aussi importantes à considérer. En outre, le type de tissu étudié semble avoir une incidence importante sur la plage dynamique de la microscopie confocale. Par exemple, pour le tissu tumoral de patiente analysé à la *Figure 3.7*, des viabilités moyennes allant de 45% jusqu'à près de 90% ont été mesurées. Pour le tissu de foie de la *Figure A.6* (Annexe A), les viabilités se sont étalées de 35% à 80%, en moyenne. Malheureusement, aucune donnée de cytométrie en flux n'était alors disponible pour ces expériences qui ne sont donc pas représentées dans les graphiques de corrélation.

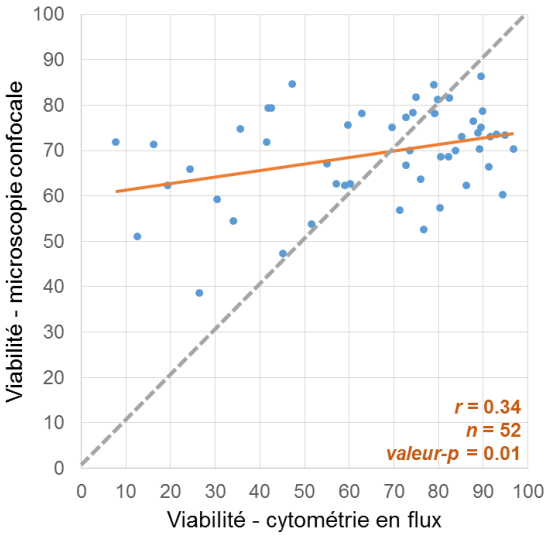


Figure 5.2: Graphique de corrélation entre les données de viabilité mesurées en microscopie confocale et en cytométrie en flux après l'ajout des points de faible viabilité. r et n sont respectivement le coefficient de Pearson et le nombre de points considérés. La ligne grise pointillée montre la courbe idéale de corrélation qui maximiserait la plage dynamique de détection en microscopie confocale.

En somme, des trois techniques étudiées, la cytométrie en flux offre les résultats les plus robustes, mais c'est aussi la technique qui nécessite le plus de tissu et le plus de manipulations de l'usager. Des modifications à la technique de microscopie confocale, comme l'utilisation de nouveaux marqueurs et la poursuite de l'amélioration de l'algorithme de segmentation, pourraient aider à améliorer la corrélation avec la cytométrie et à accroître la plage dynamique de la technique. La détection du biomarqueur de mortalité LDH pourrait aussi offrir des lectures intéressantes du

tissu cancéreux mourant à condition de limiter la dégradation de l'enzyme sécrétée et de valider l'absence d'interaction du test de détection avec les nouveaux composants appliqués.

5.1.4 Tests de chimiothérapie sur puce

Le test préliminaire de chimiothérapie appliquée sur un échantillon de tumeur humaine décrit à la section 3.4 semble prometteur, mais la procédure reste à valider avec un nombre plus important d'échantillons. Idéalement, vu les difficultés notées pour la technique de microscopie confocale, il faudrait aussi inclure des mesures de cytométrie en flux. Cette technique d'analyse n'est toutefois pas parfaite non plus, car certains tissus sont plus difficiles à fragmenter et à marquer que d'autres. Pour une preuve de concept plus complète, l'étude devrait être faite avec des groupes de tissus sensibles et résistants à la chimiothérapie d'intérêt. Les résultats permettraient de valider qu'une mortalité plus élevée serait induite dans le groupe sensible comparativement au groupe résistant. Des études en ce sens ont déjà été initiées au CRCHUM en utilisant des xénogreffes de souris formées de cellules ayant différentes sensibilités au traitement de carboplatine. Aussi, ces tests pourraient servir à déterminer le nombre minimal de TMD nécessaires pour produire des résultats statistiquement significatifs. Effectivement, il se peut que les cinq TMD d'un canal ne suffisent pas en microscopie confocale. En cytométrie, il faudrait au moins deux systèmes par condition pour produire des statistiques sur les échantillons étudiés.

Pour que la procédure puisse éventuellement être employée comme test prédictif de réponse aux médicaments, il faudra en plus exposer le tissu à plusieurs chimiothérapies en parallèle. Cela nécessitera un nombre plus important de TMD produites à partir du tissu du patient. La technique de coupe devra donc être davantage optimisée pour minimiser les pertes de tissu et réduire les temps de manipulation.

5.2 Défis à surmonter

De manière générale, la complexité d'utilisation d'un modèle cellulaire s'accroît avec la tridimensionnalité du tissu et avec l'emploi d'échantillons primaires. Dans ce projet de maîtrise, ces deux caractéristiques ont été exploitées en même temps afin d'augmenter la pertinence biologique des échantillons étudiés et afin d'offrir un modèle empirique sur lequel l'efficacité de traitements pourrait être testée pour les patients atteints de cancers solides. Plusieurs aspects de la méthode ont été résolus, comme la coupe du tissu en de nombreux échantillons, le maintien d'une

viabilité convenable du tissu cultivé *in vitro* et l'incubation dans un système simple au travers duquel l'oxygène et le dioxyde de carbone peuvent diffuser. Plusieurs défis restent toutefois à surmonter avant que ces tissus primaires tridimensionnels puissent être utilisés pour caractériser la sensibilité du cancer à différents traitements.

Premièrement, les tissus primaires sont hétérogènes; différentes portions du tissu peuvent donc comporter des proportions variables de cellules viables provenant de différentes sous-populations cancéreuses, stromales et immunitaires. Cette variabilité intrinsèque du tissu fait en sorte que les TMD ne sont pas toutes identiques. La variance entre les groupes de TMD exposées à différents traitements devient moins significative comparée à la variance intra-groupe. L'évaluation de cinq TMD par système compense partiellement cette variabilité, mais il est fort probable qu'un nombre plus important d'échantillons soit nécessaire pour compenser complètement l'hétérogénéité des tumeurs humaines. Puisqu'il n'est pas forcément possible de multiplier le nombre d'échantillons par condition en raison de la quantité limitée de tissu, une solution alternative consisterait à interroger plusieurs fois les mêmes échantillons avant et après l'application d'un traitement particulier. Cela peut déjà être accompli par la détection du marqueur de mortalité LDH dans le milieu extrait des mêmes systèmes à différent temps d'analyse. Une autre possibilité serait de marquer les mêmes échantillons à plusieurs reprises en utilisant différents marqueurs fluorescents n'affectant pas les cellules, puis de les imager par microscopie confocale ou toute autre technique alternative de microscopie en fluorescence. Par exemple, avant l'application d'un traitement, la viabilité initiale des TMD pourrait être évaluée par microscopie confocale en utilisant le CTG pour marquer les cellules viables et le marqueur *LIVE/DEAD® Fixable Far Red Dead Cell Stain* pour marquer les cellules mortes. Après le traitement, une seconde lecture de viabilité pourrait être faite en utilisant une autre couleur de la gamme *CellTracker®* (orange, par exemple) pour marquer les cellules viables ainsi que le même marqueur dans le rouge lointain pour les cellules mortes. Les deux mesures d'avant et d'après traitement pourraient être pairées dans les tests statistiques, ce qui diminuerait l'influence de la variabilité inter-échantillon sur les résultats. De plus, le marqueur de mortalité dans le rouge lointain colore le même compartiment cellulaire que les marqueurs *CellTracker®*, ce qui améliorerait la performance de l'algorithme de segmentation.

Deuxièmement, la profondeur d'imagerie est limitée en microscopie confocale. La microscopie demeure attrayante, en particulier à cause de sa capacité à analyser individuellement

l'évolution de cinq TMD indépendantes d'un système et en raison de la possibilité d'automatiser la prise de mesure. Pour améliorer la profondeur d'imagerie du tissu, une solution serait de le fixer et de le rendre transparent [75]. Cela pourrait augmenter la profondeur de pénétration jusqu'à 500 µm, mais la procédure serait longue, pourrait être difficile à effectuer dans les microsystèmes et ne permettrait qu'une mesure de viabilité par TMD. La microscopie à deux photons a aussi été explorée en utilisant du tissu de foie (voir la section A.2.1.3 de l'Annexe A) et la technique a permis d'imager jusqu'à 100 µm de profond. Il s'agit d'une amélioration majeure, mais toujours insuffisante pour imager la totalité d'une TMD, en particulier son centre plus susceptible à un phénomène d'hypoxie et sa partie supérieure plus exposée aux traitements. Pour réussir à imager au moins la moitié de l'échantillon, une profondeur de 150 µm devrait être atteinte. Cela pourrait être accompli grâce à la microscopie à feuillet de lumière (en anglais : *light sheet fluorescence microscopy*) qui permet d'exciter un échantillon avec un mince feuillet de lumière (de quelques micromètres d'épaisseur) perpendiculaire à la direction d'observation du spécimen. En plus de permettre d'imager des spécimens aux dimensions près du millimètre, l'acquisition se fait très rapidement (environ une seconde par tranche optique de 10 megapixels) [17].

Troisièmement, les quantités de tissu cancéreux obtenues par biopsie sont très limitées. Par exemple, une biopsie de prostate fournirait seulement autour de 7 mm^3 de tissu [25], correspondant à environ 200 fois le volume d'une TMD. Cependant, la procédure de coupe actuelle conduit à des pertes importantes de tissu. Cela ne pose pas autant problème pour le tissu provenant de xénogreffes ou de chirurgies de patients, car le volume de tissu est généralement beaucoup plus important. Des modifications à la procédure de coupe devraient tout de même être envisagées pour réduire les pertes et pour mieux adapter la procédure à la coupe de biopsies. Il pourrait être intéressant d'investiguer d'autres instruments pour trancher le tissu, en particulier l'instrument microtome VT1200 (ou VT1200 S) de Leica qui a été utilisé avec succès pour produire des tranches de tissu cancéreux à partir d'échantillons frais provenant de 271 patients différents (cancers du colon, du poumon et de la prostate) [22]. De plus, un autre groupe de recherche a simplement utilisé un scalpel pour couper les échantillons à environ 500 µm de diamètre [76]. Ces échantillons de tissu ont ensuite été cultivés en suspension sous agitation giratoire pendant un à deux jours, ce qui a produit des échantillons hautement viables qui ont ensuite été analysés par spectrométrie d'impédance. Une technique similaire de coupe et de pré-incubation pourrait être envisagée, peut-

être en utilisant un scalpel à lames multiples espacées de 0,5 mm, pour maximiser le nombre de TMD obtenues par tranche de tissu.

Finalement, la viabilité n'est probablement pas suffisante à elle seule pour mesurer l'action de chimiothérapies. L'analyse de la prolifération et du cycle cellulaire par cytométrie en flux pourrait être fort utile. En microscopie, la taille et la morphologie des TMD pourraient être d'autres facteurs à considérer. Une version modifiée du test des comètes servant à mesurer la dégradation de l'ADN d'un tissu a aussi été développée et pourrait être intéressante à implémenter sur les TMD [77]. Enfin, la spectroscopie d'impédance a déjà été employée pour mesurer la densité cellulaire et la viabilité d'échantillons de tumeur de tailles similaires aux TMD [76]. Ce type de mesure pourrait être fait directement sur puce si des détecteurs étaient intégrés aux côtés des puits, ce qui augmenterait bien sûr la complexité et le coût de fabrication des plateformes.

Pour terminer, il existe donc des limites – décrites dans ce chapitre – aux techniques développées. Néanmoins, les résultats présentés dans ce mémoire ont permis d'établir les bases d'une toute nouvelle technique d'incubation de micro-fragments de tissu cancéreux primaire à l'intérieur d'une plateforme microfluidique simple conçue sur mesure. Plusieurs améliorations ont été proposées qui pourront faire l'objet d'expériences futures.

CHAPITRE 6 CONCLUSION

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, une technique de découpe du tissu cancéreux en de nombreux échantillons sous-millimétriques individuels a été développée. Leur petite taille facilite leur manipulation à l'intérieur de canaux microfluidiques et aide à préserver leur viabilité en permettant le transport diffusif de nutriments jusqu'en leur centre. Ensuite, un nouveau design de plateforme microfluidique a été conçu pour piéger ces échantillons de manière stable et en minimisant les contraintes de cisaillement sur le tissu. La procédure de découpe et d'incubation du tissu tumoral primaire a été d'abord optimisée en utilisant quatre différents types de xénogreffes humaines en souris dérivées de cellules de cancers de la prostate et de l'ovaire. La viabilité des échantillons ainsi produits a pu être évaluée par trois méthodes : l'imagerie des TMD par microscopie confocale, l'analyse du stade d'apoptose des cellules composant les TMD par cytométrie en flux et la détection du marqueur de mortalité lactate déshydrogénase sécrété par le tissu. Ensuite, la procédure a été testée de manière préliminaire avec un échantillon de tumeur extrait d'une patiente atteinte du cancer de l'ovaire.

Malgré plusieurs défis qui restent à surmonter, ce projet a le potentiel de générer des impacts sociaux-économiques à plusieurs niveaux, en partant du développement de nouveaux médicaments jusqu'à leur administration chez les patients. D'abord, l'outil pourra être utilisé en recherche et développement tant au niveau industriel qu'universitaire pour tester l'efficacité de nouveaux traitements, pour étudier les mécanismes de livraison de thérapies et pour élucider les mécanismes d'évolution du cancer. Vu la petite taille des canaux, l'utilisation de réactifs coûteux sera réduite. Une plus faible utilisation de modèles animaux devrait s'ensuivre, diminuant aussi les coûts. En milieu hospitalier, l'outil rendra l'approche davantage personnalisée en permettant de tester l'efficacité des traitements avant leur administration chez les patients. Cela diminuera les coûts en évitant les traitements de première ligne inefficaces chez certains patients et en choisissant, dès le départ, la solution la plus susceptible de produire des résultats positifs. Les patients, quant à eux, éviteront les effets secondaires liés à des traitements inefficaces et verront leurs chances de guérison augmentées par une application plus rapide des traitements adaptés à leur situation. La flexibilité du système, induite par l'interchangeabilité des échantillons testés (sphéroïdes et biopsies de tumeurs), par son adaptabilité à plusieurs types de cancers, ainsi que par son utilité potentielle dans plusieurs sphères de l'industrie biomédicale, pourrait favoriser l'adoption de cette technologie pour le développement et la prescription de médicaments anti-cancer.

LISTE DE RÉFÉRENCES

[1] Canadian Cancer Society's Advisory et Committee on Cancer Statistics, "Canadian Cancer Statistics 2014," Toronto, ON, 2014.

[2] T. Högberg, B. Glimelius et P. Nygren, "A systematic overview of chemotherapy effects in ovarian cancer.," *Acta Oncol.*, vol. 40, no. 2–3, pp. 340–60, 2001.

[3] M. Hofman, J. L. Ryan, C. D. Figueroa-Moseley, P. Jean-Pierre et G. R. Morrow, "Cancer-related fatigue: the scale of the problem.," *Oncologist*, vol. 12-Sl 1, pp. 4–10, 2007.

[4] L. Chin, J. N. Andersen et P. A. Futreal, "Cancer genomics: from discovery science to personalized medicine.," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 3, pp. 297–303, 2011.

[5] P. A. Futreal, L. Coin, M. Marshall, T. Down, T. Hubbard, R. Wooster, N. Rahman et M. R. Stratton, "A census of human cancer genes.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 3, pp. 177–183, 2004.

[6] K. Yoshida et Y. Miki, "Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage," *Cancer Sci.*, vol. 95, no. 11, pp. 866–871, 2004.

[7] P. C. Fong, D. S. Boss, T. A. Yap, A. Tutt, P. Wu, M. Mergui-Roelvink, P. Mortimer, H. Swaisland, A. Lau, M. J. O'Connor, A. Ashworth, J. Carmichael, S. B. Kaye, J. H. M. Schellens et J. S. de Bono, "Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers," *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, no. 2, pp. 123–134, 2009.

[8] A. A. Ayantunde et S. L. Parsons, "Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: A retrospective study," *Ann. Oncol.*, vol. 18, no. 2, pp. 945–949, 2007.

[9] W. J. Allard, J. Matera, M. C. Miller, M. Repollet, M. C. Connelly, C. Rao, A. G. J. Tibbe, J. W. Uhr et L. W. M. M. Terstappen, "Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases," *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 20, pp. 6897–6904, 2004.

[10] R. Siegel, J. Ma, Z. Zou et A. Jemal, "Cancer Statistics, 2014," vol. 64, no. 1, pp. 9–29, 2014.

[11] M. Hay, D. W. Thomas, J. L. Craighead, C. Economides et J. Rosenthal, "Clinical development success rates for investigational drugs," *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 1, pp. 40–51, 2014.

[12] N. E. Sharpless et R. A. Depinho, "The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 9, pp. 741–754, 2006.

[13] C. G. Begley et L. M. Ellis, "Drug development: Raise standards for preclinical cancer research," *Nature*, vol. 483, no. 7391, pp. 531–533, 2012.

[14] E. H. Rubin et D. G. Gilliland, “Drug development and clinical trials—the path to an approved cancer drug,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 9, no. 4, pp. 215–222, 2012.

[15] T. Vargo-Gogola et J. M. Rosen, “Modelling breast cancer: one size does not fit all,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 9, pp. 659–672, 2007.

[16] J. Bin Kim, “Three-dimensional tissue culture models in cancer biology,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 15, no. 5, pp. 365–377, 2005.

[17] F. Pampaloni, E. G. Reynaud et E. H. K. Stelzer, “The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 10, pp. 839–45, 2007.

[18] L. G. Griffith et M. A. Swartz, “Capturing complex 3D tissue physiology in vitro,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 211–224, 2006.

[19] S. Ghosh, G. C. Spagnoli, I. Martin, S. Ploegert, P. Demougin, M. Heberer et A. Reschner, “Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 204, no. 2, pp. 522–531, 2005.

[20] M. Zietarska, C. M. Maugard, A. Filali-Mouhim, M. Alam-Fahmy, P. N. Tonin, D. M. Provencher et A.-M. Mes-Masson, “Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC),” *Mol. Carcinog.*, vol. 46, no. 10, pp. 872–885, 2007.

[21] F. T. Unger, I. Witte et K. A. David, “Prediction of individual response to anticancer therapy: historical and future perspectives,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72, no. 4, pp. 729–757, 2014.

[22] V. Vaira, G. Fedele, S. Pyne, E. Fasoli, G. Zadra, D. Bailey, E. Snyder, A. Faversani, G. Coggi, R. Flavin, S. Bosari et M. Loda, “Preclinical model of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 18, pp. 8352–6, 2010.

[23] I. A. de Graaf, G. M. Groothuis et P. Olinga, “Precision-cut tissue slices as a tool to predict metabolism of novel drugs,” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 3, no. 6, pp. 879–98, 2007.

[24] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, 2006.

[25] C. Öbek, T. Doanca, S. Erdal, S. Erdoğan et H. Durak, “Core length in prostate biopsy: Size matters,” *J. Urol.*, vol. 187, no. 6, pp. 2051–2055, 2012.

[26] A. Mandal, “Avastin (Bevacizumab) Price,” *News Medical*, 2014. [En ligne]. Disponible : http://www.news-medical.net/health/Avastin-(Bevacizumab)-Price.aspx. [Consulté le 03 mai 2015].

[27] P. J. A. Kenis, R. F. Ismagilove et G. M. Whitesides, “Microfabrication Inside Capillaries Using Multiphase Laminar Flow Patterning,” *Science*, vol. 285, no. 5424. pp. 83–85, 1999.

[28] Y. Xia et G. M. Whitesides, “Soft Lithography,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 37, no. 5, pp. 550–575, 1998.

[29] A. K. Au, W. Lee et A. Folch, “Mail-order microfluidics: evaluation of stereolithography for the production of microfluidic devices,” *Lab Chip*, vol. 14, no. 7, pp. 1294–301, 2014.

[30] T. Das, L. Meunier, L. Barbe, D. Provencher, O. Guenat, T. Gervais et A.-M. Mes-Masson, “Empirical chemosensitivity testing in a spheroid model of ovarian cancer using a microfluidics-based multiplex platform,” *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 1, pp. 1–15, 2013.

[31] D. Huh, G. A. Hamilton et D. E. Ingber, “From 3D cell culture to organs-on-chips,” *Trends Cell Biol.*, vol. 21, no. 12, pp. 745–54, 2011.

[32] L. Liu, K. Loutherback, D. Liao, D. Yeater, G. Lambert, A. Estévez-Torres, J. C. Sturm, R. H. Getzenberg et R. H. Austin, “A microfluidic device for continuous cancer cell culture and passage with hydrodynamic forces,” *Lab Chip*, vol. 10, no. 14, pp. 1807–13, 2010.

[33] P. J. Hung, P. J. Lee, P. Sabounchi, R. Lin et L. P. Lee, “Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 89, no. 1, pp. 1–8, 2005.

[34] B. Patra, Y. H. Chen, C. C. Peng, S. C. Lin, C. H. Lee et Y. C. Tung, “A microfluidic device for uniform-sized cell spheroids formation, culture, harvesting and flow cytometry analysis,” *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 5, pp. 1–11, 2013.

[35] A. Y. Hsiao, Y. Torisawa, Y.-C. Tung, S. Sud, R. S. Taichman, K. J. Pienta et S. Takayama, “Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 16, pp. 3020–7, 2009.

[36] K. Ziółkowska, A. Stelmachowska, R. Kwapiszewski, M. Chudy, A. Dybko et Z. Brzózka, “Long-term three-dimensional cell culture and anticancer drug activity evaluation in a microfluidic chip,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 40, no. 1, pp. 68–74, 2013.

[37] J. Ruppen, L. Cortes-Dericks, E. Marconi, G. Karoubi, R. A. Schmid, R. Peng, T. M. Marti, and O. T. Guenat, “A microfluidic platform for chemoresistive testing of multicellular pleural cancer spheroids,” *Lab Chip*, vol. 14, no. 6, pp. 1198–205, 2014.

[38] H. Cao, H. Deng et Y. Wang, “Segmentation of M-FISH Images for Improved Classification of Chromosomes with an Adaptive Fuzzy C-means Clustering Algorithm,” *IEEE Transactions on Fuzzy Systems*, vol. 20, no. 1, pp. 1–7, 2012.

[39] S. L. Stott, C.-H. Hsu, D. I. Tsukrov, M. Yu, D. T. Miyamoto, B. A. Waltman, S. M. Rothenberg, A. M. Shah, M. E. Smas, G. K. Korir, F. P. Floyd, A. J. Gilman, J. B. Lord, D. Winokur, S. Springer, D. Irimia, S. Nagrath, L. V. Sequist, R. J. Lee, K. J. Isselbacher, S. Maheswaran, D. A. Haber et M. Toner, "Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 43, pp. 18392–7, 2010.

[40] T. M. Geislinger et T. Franke, "Sorting of circulating tumor cells (MV3-melanoma) and red blood cells using non-inertial lift," *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 4, pp. 1–9, 2013.

[41] B. J. Kirby, M. Jodari, M. S. Loftus, G. Gakhar, E. D. Pratt, C. Chanel-Vos, J. P. Gleghorn, S. M. Santana, H. Liu, J. P. Smith, V. N. Navarro, S. T. Tagawa, N. H. Bander, D. M. Nanus et P. Giannakakou, "Functional characterization of circulating tumor cells with a prostate-cancer-specific microfluidic device," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, p. e35976, 2012.

[42] V. M. Peterson, C. M. Castro, J. Chung, N. C. Miller, A. V. Ullal, M. D. Castano, R. T. Penson, H. Lee, M. J. Birrer et R. Weissleder, "Ascites analysis by a microfluidic chip allows tumor-cell profiling.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 51, pp. E4978–86, 2013.

[43] Y. Huang, J. C. Williams et S. M. Johnson, "Brain slice on a chip: opportunities and challenges of applying microfluidic technology to intact tissues," *Lab Chip*, vol. 12, no. 12, pp. 2103–17, 2012.

[44] P. M. van Midwoud, E. Verpoorte et G. M. M. Groothuis, "Microfluidic devices for in vitro studies on liver drug metabolism and toxicity," *Integr. Biol. (Camb).*, vol. 3, no. 5, pp. 509–21, 2011.

[45] S. M. Hattersley, D. C. Sylvester, C. E. Dyer, N. D. Stafford, S. J. Haswell et J. Greenman, "A microfluidic system for testing the responses of head and neck squamous cell carcinoma tissue biopsies to treatment with chemotherapy drugs," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 40, no. 6, pp. 1277–88, 2012.

[46] D. Sylvester, S. M. Hattersley, N. D. Stafford, S. J. Haswell et J. Greenman, "Development of Microfluidic-based Analytical Methodology for Studying the Effects of Chemotherapy Agents on Cancer Tissue," *Curr. Anal. Chem.*, vol. 9, no. 1, pp. 2–8, 2013.

[47] T. C. Chang, A. M. Mikheev, W. Huynh, R. J. Monnat, R. C. Rostomily et A. Folch, "Parallel microfluidic chemosensitivity testing on individual slice cultures," *Lab Chip*, vol. 14, no. 23, pp. 4540–51, 2014.

[48] D. M. Provencher, H. Lounis, L. Champoux, M. Tétrault, E. N. Manderson, J. C. Wang, P. Eydoux, R. Savoie, P. N. Tonin et A. M. Mes-Masson, "Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines," *In vitro cellular & developmental biology–Animal*, vol. 36, no. 6. pp. 357–361, 2000.

[49] M. Amiji et K. Park, "Prevention of protein adsorption and platelet adhesion on surfaces by PEO/PPO/PEO triblock copolymers," *Biomaterials*, vol. 13, no. 10, pp. 682–692, 1992.

[50] "Diagram of confocal principle," *Wikimedia Commons*, 2006. [En ligne]. Disponible : http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Confocalprinciple_in_English.svg. [Consulté le 22 avril 2015].

[51] Thermo Fisher Scientific Inc., "CellTracker™ Fluorescent Probes," 2014.

[52] Molecular Probes, "Propidium Iodide Nucleic Acid Stain," 2006.

[53] Thermo Fisher Scientific Inc., "Fluorescence SpectraViewer," *Life Technologies*, 2015. [En ligne]. Disponible : https://www.lifetechnologies.com/ca/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html. [Consulté le 22 mars 2015].

[54] "Fluorescence Assisted Cell Sorting (FACS) showing positive cell selection," *Wikimedia Commons*, 2011. [En ligne]. Disponible : http://commons.wikimedia.org/wiki/File: Fluorescence_Assisted_Cell_Sorting_(FACS)_B.jpg. [Consulté le 22 avril 2015].

[55] P. M. van Midwoud, M. T. Merema, N. Verweij, G. M. M. Groothuis et E. Verpoorte, "Hydrogel embedding of precision-cut liver slices in a microfluidic device improves drug metabolic activity.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 108, no. 6, pp. 1404–12, 2011.

[56] Roche Applied Science, "Cytotoxicity Detection Kit PLUS (LDH)," 2011.

[57] Promega, "CytoTox-ONE ™ Homogeneous Membrane Integrity Assay," 2009.

[58] T. A. Krouskop, T. M. Wheeler, F. Kallel, B. S. Garra et T. Hall, "Elastic moduli of breast and prostate tissues under compression," *Ultrason. Imaging*, vol. 20, no. 4, pp. 260–274, 1998.

[59] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics*. New York: Oxford University Press Inc., 2009.

[60] G. K. Batchelor, *An Introduction to Fluid Dynamics*, Illustrate. Cambridge University Press, 2000.

[61] J. F. Petersen, L. V. McIntire et E. T. Papoutsakis, "Shear sensitivity of cultured hybridoma cells (CRL-8018) depends on mode of growth, culture age and metabolite concentration," *J. Biotechnol.*, vol. 7, no. 3, pp. 229–246, 1988.

[62] H. Lu, L. Y. Koo, W. M. Wang, D. A. Lauffenburger, L. G. Griffith et K. F. Jensen, "Microfluidic shear devices for quantitative analysis of cell adhesion," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 18, pp. 5257–5264, 2004.

[63] R. Thomlinson et L. Gray, "The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy," *Br. J. Cancer*, vol. 9, no. 4, pp. 539–549, 1955.

[64] R. Sander, "Compilation of Henry's law constants, version 3.99," *Atmos. Chem. Phys. Discuss.*, vol. 14, no. 21, pp. 29615–30521, 2014.

[65] P. Vaupel, H. P. Fortmeyer, S. Runkel et F. Kallinowski, “Blood flow, oxygen consumption, and tissue oxygenation of human breast cancer xenografts in nude rats,” *Cancer Res.*, vol. 47, no. 13, pp. 3496–3503, 1987.

[66] J. Grote, R. Süsskind et P. Vaupel, “Oxygen diffusivity in tumor tissue (DS-Carcinosarcoma) under temperature conditions within the range of 20-40°C,” *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 372, no. 1, pp. 37–42, 1977.

[67] P. Han et D. M. Bartels, “Temperature Dependence of Oxygen Diffusion in H_2O and D_2O,” *J. Phys. Chem.*, vol. 100, no. 13, pp. 5597–5602, 1996.

[68] H. L. T. Lee, P. Boccazzi, R. J. Ram et A. J. Sinskey, “Microbioreactor arrays with integrated mixers and fluid injectors for high-throughput experimentation with pH and dissolved oxygen control,” *Lab Chip*, vol. 6, no. 9, pp. 1229–1235, 2006.

[69] R. Ivanova et G. Simeonov, “A formula for the oxygen uptake of thin tissue slice in terms of its surface oxygen tension,” *Comput. Math. with Appl.*, vol. 64, no. 3, pp. 322–336, 2012.

[70] J. W. Boyd, “The rates of disappearance of L-lactate dehydrogenase isoenzymes from plasma,” *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Enzymology*, vol. 132, no. 2, pp. 221–231, 1967.

[71] Olympus America Inc., K. Spring, T. J. R. Fellers et M. W. Davidson, “Signal-to-Noise Considerations,” *Olympus Microscopy Resource Center*, 2012. [En ligne]. Disponible : http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/signaltonoise.html. [Consulté le 15 mars 2015].

[72] R. C. Gonzalez et R. E. Woods, *Digital image processing*, 3rd edition. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Prentice Hall, 2008.

[73] T. Suzuki, K. Fujikura, T. Higashiyama et K. Takata, “DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy,” *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 45, no. 1, pp. 49–53, 1997.

[74] K. Chung, Y. Kim, J. S. Kanodia, E. Gong, S. Y. Shvartsman et H. Lu, “A microfluidic array for large-scale ordering and orientation of embryos,” vol. 8, no. 2, 2011.

[75] R. M. Zucker, “Whole insect and mammalian embryo imaging with confocal microscopy: morphology and apoptosis.,” *Cytometry Part A*, vol. 69, no. 11, pp. 1143–52, 2006.

[76] H.-G. Jahnke, S. Poenick, J. Maschke, M. Kendler, J. C. Simon et A. A. Robitzki, “Direct Chemosensitivity Monitoring Ex Vivo on Undissociated Melanoma Tumor Tissue by Impedance Spectroscopy,” *Cancer Res.*, vol. 74, no. 9, pp. 6408–6418, 2014.

[77] J. Plazar, I. Hreljac, P. Pirih, M. Filipic et G. M. M. Groothuis, “Detection of xenobiotic-induced DNA damage by the comet assay applied to human and rat precision-cut liver slices,” *Toxicol. In Vitro*, vol. 21, no. 6, pp. 1134–42, 2007.

[78] I. A. M. de Graaf, P. Olinga, M. H. de Jager, M. T. Merema, R. de Kanter, E. G. van de Kerkhof et G. M. M. Groothuis, “Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies,” *Nat. Protoc.*, vol. 5, no. 9, pp. 1540–1551, 2010.

[79] V. E. Centonze et J. G. White, “Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging,” *Biophys. J.*, vol. 75, no. 4, pp. 2015–24, 1998.

[80] W. R. Zipfel, R. M. Williams et W. W. Webb, “Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 11, pp. 1369–77, 2003.

[81] F. Helmchen et W. Denk, “Deep tissue two-photon microscopy,” *Nat. Methods*, vol. 2, no. 12, pp. 932–40, 2005.

[82] F. Bestvater, E. Spiess, G. Stobrawa, M. Hacker, T. Feurer, T. Porwol, U. Berchner-Pfannschmidt, C. Wotzlaw et H. Acker, “Two-photon fluorescence absorption and emission spectra of dyes relevant for cell imaging,” *J. Microsc.*, vol. 208, no. 2, pp. 108–115, 2002.

[83] S. J. Cutler et J. H. Block, “Metabolic Changes of Drugs and Related Organic Compounds,” in *Wilson and Gisvold’s Textbook of Organic, Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 12th ed., J. M. Beale and J. H. Block, Eds. Lippincott Williams & Wilkins, 2011, pp. 43–118.

[84] P. M. van Midwoud, G. M. M. Groothuis, M. T. Merema et E. Verpoorte, “Microfluidic biochip for the perifusion of precision-cut rat liver slices for metabolism and toxicology studies,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 105, no. 1, pp. 184–94, 2010.

[85] S. L. Nyberg, R. P. Remmel, H. J. Mann, M. V. Peshwa, W. S. Hu et F. B. Cerra, “Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver,” *Ann. Surg.*, vol. 220, no. 1, pp. 59–67, 1994.

[86] R. De Kanter, M. H. De Jager, A. L. Draaisma, J. U. Jurva, P. Olinga, D. K. F. Meijer et G. M. M. Groothuis, “Drug metabolizing activity of human and rat liver, lung, kidney and intestine slices,” *Xenobiotica*, vol. 32, no. 5, pp. 349–362, 2002.

[87] P. M. van Midwoud, M. T. Merema, E. Verpoorte et G. M. M. Groothuis, “Microfluidics enables small-scale tissue-based drug metabolism studies with scarce human tissue,” *J. Lab. Autom.*, vol. 16, no. 6, pp. 468–76, 2011.

ANNEXE A CULTURE SUR PUCE DE MICRO-FRAGMENTS DE FOIE

Pendant le stage de trois mois dans le laboratoire de Dre Sabeth Verpoorte à l'Université de Groningue, la technique de coupe et d'incubation de tissus a pu être testée en utilisant du tissu de foie plutôt que de tumeur. En plus de valider que d'autres types de tissus peuvent être coupés et piégés dans notre plateforme microfluidique, cette collaboration a permis d'étudier la viabilité d'un tissu plus homogène pour lequel plusieurs techniques d'analyse (de viabilité et de fonction métabolique) avaient déjà été mises au point par le passé. De plus, des techniques de mesure encore jamais testées dans nos laboratoires de Montréal et nécessitant des expertises et installations spécialisées, soit la chromatographie en phase liquide à haute performance et la microscopie à deux photons, ont pu être appliquées de manière préliminaire aux échantillons de tissu micro-disséqué de foie (TMDF) pour la toute première fois. Pour chaque technique, des tranches de tissu de foie d'environ 4 mm de diamètre et de 250 µm d'épaisseur (PCLS, de l'anglais *precision-cut liver slices*) ont aussi été étudiées en parallèle afin d'établir une base de comparaison pour évaluer la performance des TMDF.

A.1 Méthodologie

A.1.1 Procédure de découpe du tissu de foie

À l'Université de Groningue, dans le laboratoire de Dre Geny Groothuis qui collabore de près avec la directrice du stage à l'étranger, du tissu de foie de rat est utilisé de manière routinière pour des études de toxicologie et de métabolisme de médicaments. Le tissu primaire est généralement étudié sous forme de tranches minces d'environ 4 mm de diamètre par 250 µm d'épais. Des tranches excédentaires de foie ont été coupées par l'équipe de Dre Groothuis pour répondre aux besoins de nos expériences de microfluidique.

La procédure de découpe des PCLS a déjà été décrite en détails dans la littérature [78]. Brièvement, tel que montré à la *Figure A.1*, des carottes de tissu ont été produites à l'aide d'un outil coupant et creux de 5 mm de diamètre (*5 mm tissue coring tool*, Alabama Research and Development, Munford, AL, É.-U.) opéré par une perceuse. Ces carottes de tissu ont ensuite été tranchées à l'aide de l'instrument *Krumdieck tissue slicer* (modèle MD6000, Alabama Research and Development, Munford, AL, É.-U.) à une épaisseur de 250 µm. Tout au long de la procédure,

le tissu a été conservé à 4°C dans du milieu de préservation UW (Du Pont Critical Care, Waukegab, IL, É.-U.) ou dans une solution tampon de Krebs-Henseleit à l'intérieur de l'instrument Krumdieck.

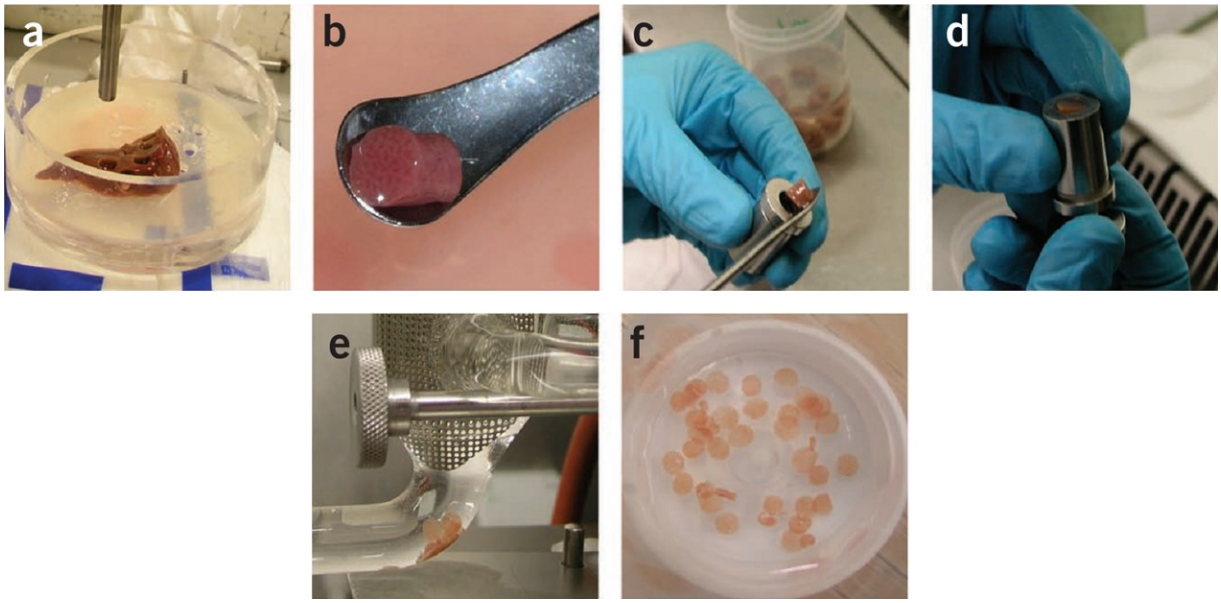


Figure A.1: Production de tranches de tissu de foie (PCLS). Figure reproduite de la référence [78] avec l'autorisation de l'éditeur. a) Production de carottes de foie de rat à l'aide d'un outil coupant et creux opéré par une perceuse montée sur un support vertical. b-d) Insertion de la carotte de tissu dans le porte-échantillon cylindrique de l'instrument Krumdieck. e) Accumulation des tranches de tissu coupées automatiquement par l'instrument Krumdieck dans le réservoir de sortie. f) Allure des tranches de foie produites et conservées dans du milieu UW à 4°C.

La suite de la procédure de coupe est similaire à celle du tissu cancéreux. Un poinçon à biopsie de 500 µm de diamètre (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, É.-U.) a été utilisé pour couper les tranches de foie en plusieurs TMDF (*Figure A.1*). Étant donné la fragilité du tissu de foie aux conditions ambiantes d'oxygène et de température, une attention particulière a été portée à le maintenir froid à 4°C dans la solution de préservation UW pendant la production des TMDF ainsi que pendant l'étape de chargement dans les microsystèmes

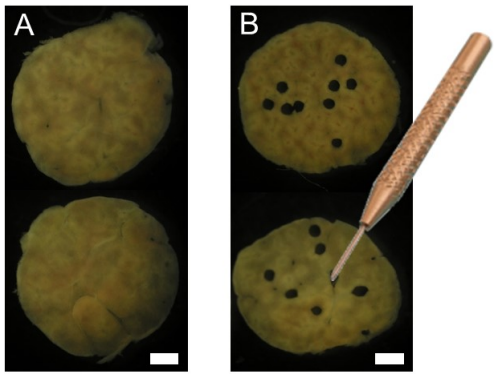


Figure A.1: Procédure de coupe des tranches de tissu de foie pour l'insertion dans les systèmes microfluidiques. A) Tranches de foie intactes imagées sous un stéréomicroscope. B) Tranches de foie comportant des trous là où des TMDF ont été extraites à l'aide d'un poinçon à biopsie de 500 µm de diamètre. Barres d'échelle ≈ 1 mm.

A.1.2 Procédure de chargement dans les systèmes microfluidiques

Les plateformes microfluidiques ont été fabriquées en suivant le même protocole que décrit à la section 2.2.2, mais les entrées et sorties ont été percées manuellement à l'aide de poinçons et les deux couches ont été assemblées en utilisant un plasma d'oxygène.

Dans le cas des systèmes recevant le tissu de foie, les surfaces des canaux n'ont pas été traitées avec le copolymère tribloc Pluronic® F-108. Après la stérilisation à l'éthanol, du milieu de préservation UW a directement été ajouté aux canaux et les plateformes ont été placées sur la glace en prévision du chargement.

La même procédure de chargement, décrite à la section 2.2.3, a été utilisée pour les micro-fragments de foie et de tumeur. Les TMDF ont été chargées dans le milieu de préservation UW plutôt que dans le HBSS et les plateformes ont été gardées froides tout au long de la procédure de chargement. Après le chargement des cinq TMDF dans un système, le milieu UW a été remplacé avec du milieu de culture de type *William's Medium E* (WME, #32551, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, É.-U.), supplémenté avec 14 mM de glucose et 50 µg/mL de gentamicine, préchauffé à 37°C et équilibré au carbogène (95% O_2, 5% CO_2). Avec environ 20 µL de milieu dans les entrées, les plateformes chargées ont été replacées dans une chambre humide, à l'intérieur d'un incubateur maison (37°C, 95% O_2, 5% CO_2) tel que montré à la *Figure A.2*.

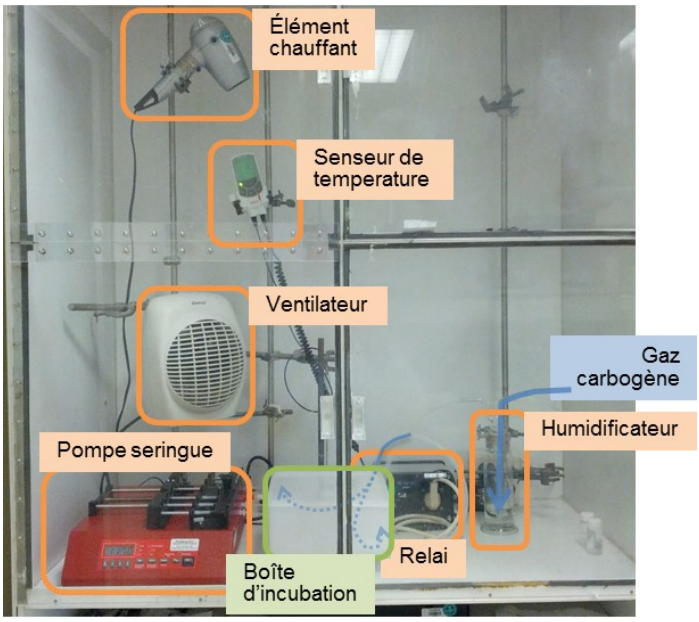


Figure A.2: Incubateur maison utilisé pour cultiver les TMDF. Pour garder la température constante à 37°C, un élément chauffant est contrôlé par le relai déclenché lorsque le senseur de température détecte une température trop basse. Le ventilateur sert à répartir la chaleur autour de la boîte d'incubation. Le gaz carbogène est injecté dans l'humidificateur et le gaz humidifié est poussé dans la boîte d'incubation via un tube de caoutchouc. La pompe seringue peut être branchée aux microsystèmes à l'intérieur de la boîte au besoin. Le tout est contenu dans une armoire vitrée et scellée, pour limiter les échanges de température avec l'extérieur.

En suivant la procédure décrite à la section 2.2.3, le milieu de culture a été changé à plusieurs reprises au cours d'une expérience, après 1, 24 et 45 heure(s) d'incubation des TMDF. Dans certaines expériences, le milieu contenait en plus des agents chimiques dont la biotransformation par l'activité métabolique du foie devait être étudiée. Les fractions de milieu ainsi collectées ont donc été conservées pour l'analyse de molécules sécrétées ou métabolisées par les TMDF pendant la période d'incubation.

A.1.3 Techniques d'analyse de viabilité

A.1.3.1 Sécrétion du marqueur de mortalité lactate déshydrogénase (LDH)

Il existe quelques différences entre les tests LDH effectués dans le laboratoire de Groningue par rapport à ceux effectués au CRCHUM en raison principalement des réactifs et instruments disponibles. À Groningue, le test a été adapté d'une procédure bien établie pour mesurer la LDH

des PCLS en utilisant un kit de détection en fluorescence (CytoTOX-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay, Promega Corporation, Madison, WI, É.-U.). Des fractions de milieu (100 µL) ont été extraites des microsystèmes aux différents temps d'analyse (*Figure 2.5*), puis conservées à 4°C jusqu'au moment du test de détection, au maximum quatre jours après le jour de coupe du tissu. Pour fins de comparaison, des PCLS complètes ont aussi été cultivées en parallèle dans une plaque à 12 puits (1 mL de milieu par puits, avec agitation) puis 1 mL de milieu a été extrait à chaque temps d'analyse. Après 45 heures d'incubation, le tissu a été extrait des systèmes (dans 100 µL de milieu) et des plaques (dans 1 mL de milieu). Dans ce cas-ci, la lyse a été accomplie par l'ajout d'un tampon de lyse (inclus dans le kit) à un ratio volumique 1:50 ainsi que par l'action mécanique d'un homogénéisateur à billes activé pendant 45 secondes. Après avoir centrifugé les échantillons lysés à 13 200 g pendant deux minutes, le surnageant était prêt à être analysé. L'analyse a été accomplie avec 50 µL d'échantillon (fraction de milieu ou surnageant de tissu lysé), 50 µL de réactif et 25 µL de solution d'arrêt. Pendant l'incubation avec le réactif à température de la pièce pendant 20 minutes (à l'abri de la lumière), la molécule résazurine est convertie en la molécule fluorescente résorufine (*Figure 2.10*) détectée à l'aide d'un lecteur à fluorescence (excitation à 560 nm et émission à 590 nm). Pour faciliter la comparaison avec les résultats précédents obtenus par cette méthode, aucun facteur de correction n'a été appliqué pour tenir compte de la dégradation de l'enzyme LDH. Chaque mesure a été normalisée par rapport à la somme des mesures de fluorescence de tous les échantillons d'un même système. Puisque la quantité de LDH relâchée est proportionnelle à la mortalité cellulaire, les données sont présentées comme un taux de mortalité (pourcentage de mort par heure).

A.1.3.2 Microscopie confocale

A.1.3.2.1 Marquage des échantillons avec des fluorophores de viabilité

Les échantillons ont été marqués en suivant essentiellement la même procédure que celle décrite pour les micro-fragments de tumeur à la section 2.3.1.1. La calcéine AM, dont le mécanisme d'action est très similaire à celui du CTG CMFDA, a été utilisée en remplacement de celui-ci pour marquer les cellules viables alors que le PI a été utilisé pour marquer les cellules mortes. Les échantillons ont été marqués séquentiellement avec une solution de milieu WME contenant de la calcéine AM (4 µM) pendant une heure, puis avec une solution de PBS contenant du PI (3 µM) pendant 20 minutes. Les systèmes ont été rincés deux fois avec du PBS avant l'imagerie.

A.1.3.2.2 Acquisition d'images au centre de microscopie de l'UMCG

Les images de TMDF ont été acquises au centre de microscopie de l'UMCG en utilisant un microscope confocal inversé de type Leica TCS SP7 (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) muni d'un objectif 20X (sans liquide d'immersion), soit un microscope très similaire à celui utilisé au CRCHUM. Essentiellement, le même protocole d'imagerie a été suivi (section 2.3.1.2), sauf que la calcéine AM et le PI ont été excités séquentiellement en utilisant des lasers de 488 nm et de 552 nm, et leur signal fluorescent a été collecté aux plages de longueurs d'onde 500-545 nm et 601-700 nm, respectivement. Les spectres d'excitation et d'émission de la calcéine AM sont presque parfaitement superposés à ceux du CTG, alors la *Figure 2.8* peut être utilisée comme référence.

A.1.3.3 Microscopie à deux photons

La microscopie à deux photons a le potentiel de doubler la profondeur d'imagerie des échantillons par rapport à la microscopie confocale [79]. Elle a été employée lors de tests préliminaires au Centre de microscopie de l'UMCG à Groningue dans le but d'imager le centre des échantillons de foie.

La microscopie à deux photons est une technique d'imagerie en fluorescence non linéaire : deux photons doivent interagir presque simultanément avec la molécule fluorescente pour l'exciter, résultant en une dépendance quadratique envers l'intensité incidente [80]. Alors en doublant l'intensité, la fluorescence quadruple. Les fluorophores sont excités par deux photons dont l'énergie vaut environ la moitié de l'énergie d'excitation. Une fois excité, le fluorophore suit un processus de désexcitation et d'émission fluorescente normal, signifiant que le spectre d'émission demeure pratiquement inchangé par rapport au spectre à un photon.

La non linéarité de cette technique d'imagerie permet de produire un sectionnement optique différent de celui produit par le microscope confocal. La probabilité que deux photons atteignent un même fluorophore dans un laps de temps suffisamment court (inférieur à $0{,}5 \times 10^{-15}$ secondes [81]) pour parvenir à additionner leurs énergies afin de l'exciter est extrêmement faible à l'extérieur du volume focal et donc aucune fluorescence ne provient de cette zone. À l'inverse, dans la zone focale, cette probabilité devient suffisante à condition qu'un laser pulsé soit utilisé. Pour produire un signal intéressant, il faut en effet concentrer l'intensité lumineuse dans l'espace (en focalisant

la lumière à l'aide d'un objectif à ouverture numérique (NA) élevée) et dans le temps (en produisant des pulses d'une durée de moins d'une picoseconde ayant une intensité élevée) [80], [81].

Cette technique a le potentiel d'augmenter la profondeur d'imagerie des tissus de deux façons. D'abord, le tissu se trouve excité à une longueur d'onde plus élevée (dans le proche infrarouge), généralement associée à des coefficients d'absorption et de diffusion plus faibles dans le tissu biologique [81]. Cela permet à une plus grande proportion des photons d'excitation de pénétrer profondément dans le tissu. Deuxièmement, grâce au sectionnement optique probabiliste, aucun sténopé n'est placé devant le détecteur. En effet, cette méthode de sectionnement assure que tous les photons qui reviennent au détecteur proviennent du volume focal et constituent le signal à détecter [81], ce qui permet de capter les photons ayant diffusé à travers le tissu qui réussissent à parvenir au détecteur.

Un microscope optique droit (non inversé) multiphotonique à balayage laser (Zeiss LSM 7MP, Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) était disponible au centre de microscopie de l'UMCG. La technique a été utilisée pour vérifier si le centre des échantillons de foie pouvait être imagé. Étant donné l'ouverture numérique élevée des objectifs de ce type de microscopie, leur distance de travail est très courte, entre 1,27 et 2,5 mm dans le cas des objectifs disponibles. Une version différente du microsystème a donc été créée pour ces tests en modifiant la couche du dessus du système. Une lamelle de verre a été employée dont les trous d'entrée et de sortie ont été perforés à l'aide d'un instrument de sablage par micro-jet d'abrasif. Deux petits morceaux percés de PDMS couvrant tout juste l'entrée et la sortie du système ont été ajoutés pour créer des réservoirs facilitant les changements de milieu. Toutes les parties des systèmes ont été assemblées suite à un traitement des surfaces au plasma d'oxygène. Au total, l'épaisseur entre le haut de la lamelle de verre et le centre de l'échantillon, correspondant à la distance de travail maximale pour imager jusqu'au centre d'un spécimen déposé au fond du puits, était d'environ 1,15 mm, soit tout juste en-dessous de la limite posée par les objectifs disponibles.

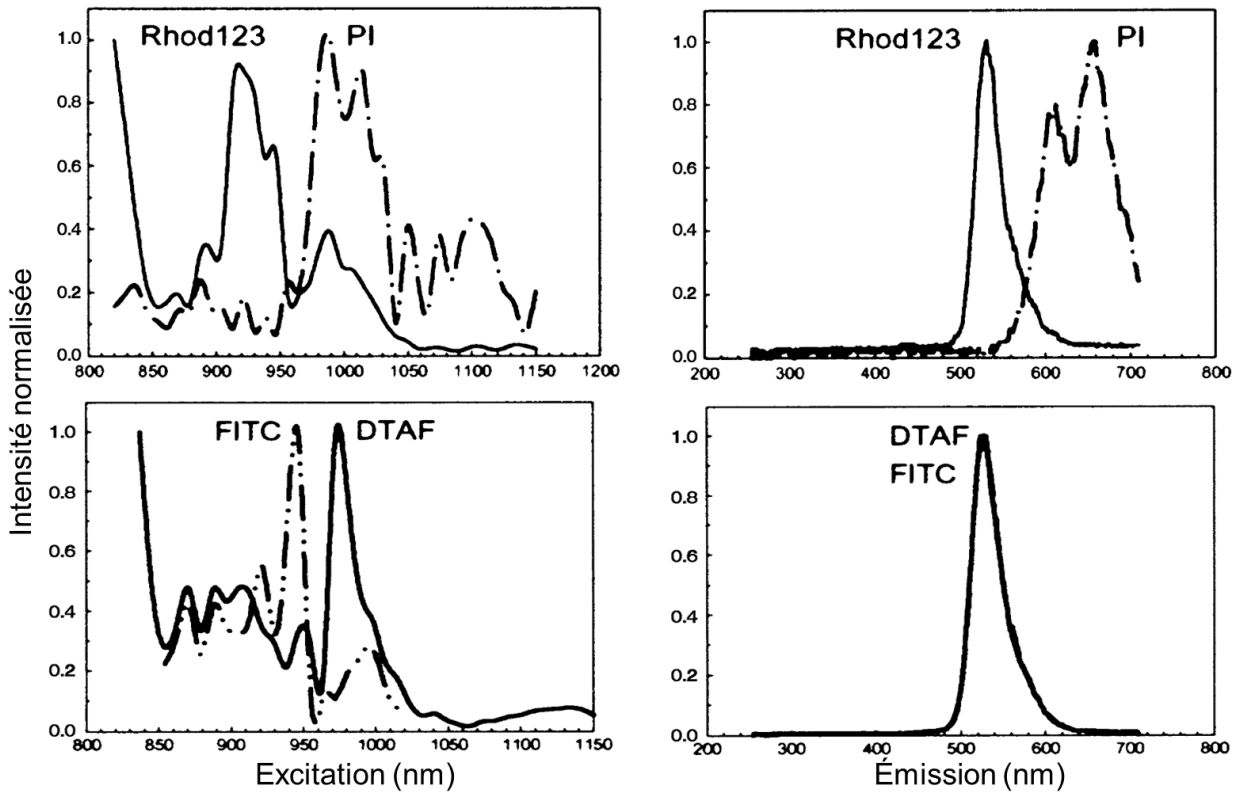


Figure A.3: Spectres d'excitation à deux photons et d'émission de fluorescence associés pour le PI et la fluorescéine (FITC). Figures reproduites de [82] avec l'autorisation de l'éditeur et légèrement modifiées.

Des spectres d'excitation à deux photons et d'émission associés ont été trouvés dans la littérature pour la fluorescéine (dont la calcéine AM est un dérivé) et le PI (*Figure A.3*, [82]) et ont été utilisés pour tenter de trouver les conditions idéales d'imagerie. Cependant, aucune procédure standardisée n'a pu être déterminée pour ce type de microscopie pendant les quelques heures consacrées à cette investigation. Les TMDF ont été marqués suivant le protocole décrit à la section A.1.3.2.1. Seuls des tests préliminaires effectués en variant l'intensité du laser, le gain des détecteurs et la longueur d'onde d'excitation ont pu être menés. Des filtres fixes étaient disponibles pour placer devant les détecteurs. Deux sets de deux filtres correspondaient bien aux longueurs d'onde d'émission théoriques de nos fluorophores. Le premier set était composé d'un premier filtre passe-bande de 525 à 560 nm et d'un second filtre passe-bande de 650 à 705 nm. L'autre set était composé d'un filtre passe-bande de 500 à 550 nm et d'un filtre passe-bande de 575 à 610 nm.

A.1.4 Analyse de l'état métabolique des micro-fragments de tissu

L'objectif premier d'une culture organotypique est de préserver, autant que possible, les caractéristiques fonctionnelles du tissu. La viabilité, bien sûr, est une condition essentielle mais non suffisante au maintien des fonctions d'un tissu. Pour le tissu de foie, l'une des fonctions à préserver est sa capacité à transformer, grâce à l'action d'enzymes spécialisées, les médicaments et d'autres composantes chimiques étrangères (xénobiotiques) qui sont généralement hydrophobes en des formes hydrophiles qui peuvent être plus facilement évacuées par le corps [83]. Certaines composantes médicamenteuses sont inactives et acquièrent une activité pharmacologique seulement au moment où elles sont métabolisées par le foie.

Les réactions de métabolisme sont séparées en deux phases. Pendant la phase I, ou la phasede fonctionnalisation, la molécule subit des transformations visant à faciliter l'ajout de petits groupements polaires et ionisables par la suite lors de la phase II dite de conjugaison [83]. La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP, en anglais : *high-performance liquid chromatography (HPLC)*) est l'une des méthodes pouvant mesurer ces réactions de métabolisme en détectant de telles petites modifications à la structure chimique d'une molécule.

A.1.4.1 Chromatographie en phase liquide à haute performance

La CLHP est une technique de séparation des molécules d'une solution dans une colonne remplie d'une phase stationnaire (constituée de grains fins solides) par laquelle circule une phase mobile (liquide). Les différentes molécules de la solution à analyser circulent à des vitesses différentes à travers la colonne en fonction de leur degré d'interaction avec la phase solide ainsi que de leur affinité avec la phase mobile.

Une technique de détection de métabolites de phase I et II de la composante 7-ethoxycoumarine a été mise au point au laboratoire de Dre Groothuis à l'Université de Groningue, tel que précédemment décrit en détails [84]. Cette xénobiotique comporte un métabolite de phase I, la 7-hydroxycoumarine (7-HC), et deux métabolites de phase II, soit la forme glucuronisée (7-HC-G) et la forme sulfatée (7-HC-S) du métabolite de phase I.

Grâce à l'aide précieuse du personnel de recherche à Groningue, en particulier Marina de Jager et Jan Visser, pour mettre en place l'instrumentation nécessaire et préparer les réactifs, cette même technique de détection a pu être testée dans le cadre du stage à l'étranger.

Les TMDF ont été exposés, à l'intérieur des microsystèmes, à 100 µM de 7-EC et de 7-HC. Pour fins de comparaison, des PCLS complètes ont aussi été exposées en parallèle, dans une plaque à 12 puits (1 mL de milieu par puits, avec agitation), aux mêmes conditions. Les échantillons ont été incubés pendant deux heures pour leur laisser le temps de métaboliser les molécules. Cette incubation a été répétée à plusieurs temps d'analyse pour suivre l'évolution de l'état métabolique du tissu de foie. Après chaque période d'incubation, la procédure de changement de milieu a été suivie pour extraire 60 µL de la sortie des systèmes traités. De l'azoture de sodium a été ajouté aux échantillons de milieu à une concentration de 1 mg/mL pour éviter leur contamination, puis les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

Une fois tous les échantillons récoltés, ils ont été transférés dans un échantillonneur automatique. Chacun des échantillons a été injecté tour à tour dans la colonne de séparation de type BDS Hypersil C8. La phase mobile était initialement composée de 7,5% d'acétonitrile, 1% d'acide acétique et 91,5% d'eau contenant 5 mM d'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium, avec un gradient linéaire sur 18 minutes jusqu'à une composition finale de 45% d'acétonitrile, 1% d'acide acétique et 54% d'eau contenant 5 mM d'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium. Les substances sortant de la colonne ont été détectées en continu à l'aide d'un lecteur d'absorbance à 320 nm. L'intensité détectée pour les pics correspondant aux métabolites d'intérêt a été comparée aux mesures des courbes d'étalonnage, produites au début et à la fin de chaque séance de prise de données, pour trouver la concentration de chaque métabolite dans la solution de milieu analysée.

A.2 Résultats

A.2.1 Analyse de viabilité

L'analyse de viabilité du tissu de foie a été accomplie à l'aide de trois techniques, dont deux en commun avec l'analyse de viabilité du tissu de tumeur. Il s'agit de la sécrétion du biomarqueur de mortalité, la lactate déshydrogénase, dans le milieu entourant les TMDF et de la microscopie confocale. Pour pousser encore plus loin la technique d'imagerie, un microscope multiphotonique a aussi été employé dans des tests préliminaires visant à imager le centre du tissu.

A.2.1.1 Sécrétion de lactate déshydrogénase

C'est à Groningue que les premiers résultats concluants de mesure de LDH sur les micro-fragments de tissu ont été obtenus. Par la suite, les apprentissages sur la technique ont été transposés à Montréal pour adapter la procédure aux échantillons de tumeurs (tel que décrit à la section 3.3.3).

La LDH a été mesurée dans les fractions de milieu collectées à la sortie des systèmes microfluidiques où étaient cultivés des TMDF ou dans le milieu prélevé des plaques à 12 puits où étaient incubées les PCLS. Les valeurs ont été normalisées à la quantité totale mesurée pour une même condition au cours de toute la période d'analyse de 45 heures afin de suivre l'évolution du taux de mortalité des mêmes échantillons dans le temps. Le nombre d'expériences indépendantes (*E*) s'est élevé à trois ou quatre. Chaque expérience a été effectuée avec du tissu de foie d'un rat différent en quadruplicat, signifiant que chaque condition a été répétée quatre fois dans chacune des expériences.

Tel que montré à la *Figure A.4*, une tendance similaire à celle décrite pour les TMD de xénogreffe de souris a été observée pour les TMDF, soit un taux de mortalité élevé au premier point d'analyse, suivi de taux beaucoup plus faibles par la suite. Toutefois, pour les échantillons de foie, une période de pré-incubation d'une heure est généralement admise et a été reproduite dans ces expériences pour la récupération du tissu, comparativement à une période de 24 heures laissée pour la récupération des échantillons de tumeur. Aussi, les échantillons de foie semblent mourir beaucoup plus rapidement que les échantillons de tumeur, tel que montré par un taux de mortalité exprimé en pourcentage par heure plutôt que par jour. Cela nous porte à croire que les échantillons de foie sont plus fragiles aux conditions d'incubation que les échantillons de tumeur. En effet, la mort cumulative mesurée pour les échantillons de tissu a atteint environ 75% après 45 heures pour le foie comparativement à seulement 48% après huit jours pour le tissu de xénogreffe le moins viable (xénogreffes de PC3). Une différence importante entre les deux types de culture est le rythme de prolifération qui est généralement beaucoup plus élevé pour les cellules tumorales [48] que pour les cellules hépatiques primaires [85].

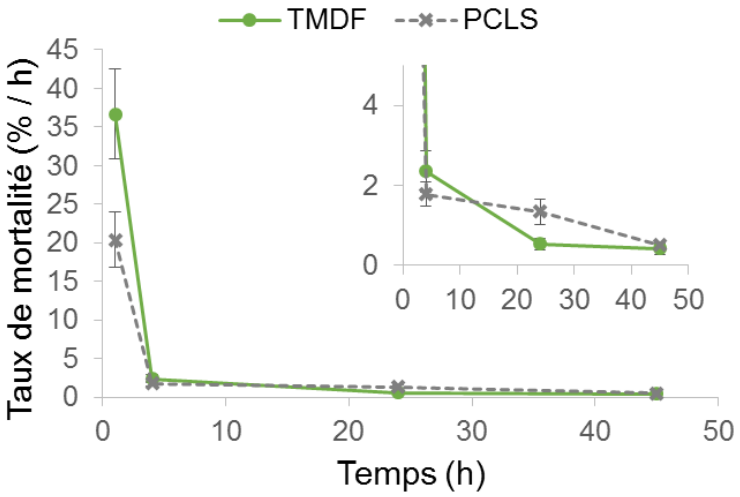


Figure A.4: Taux de mortalité pour les TMDF (ligne verte) de foie de rat et pour les PCLS (ligne pointillée grise) mesurés comme des taux de sécrétion du biomarqueur de mortalité LDH sur une période de 45 heures après le début de l'incubation. Les résultats sont normalisés à la quantité totale de LDH mesurée pour un même système ou un même puits tout au long de l'expérience. Les barres d'erreur représentent ± l'erreur type sur la moyenne de trois ou quatre expériences indépendantes.

Néanmoins, aucune différence significative n'a été notée pour les TMDF incubés dans la plateforme microfluidique comparativement aux PCLS incubées dans les plaques à 12 puits, ce qui indique que la mortalité relativement élevée des TMDF n'est pas due à la méthode d'incubation dans les microsystèmes mais est plutôt attribuable à la mort naturelle du tissu dans les conditions *in vitro* auxquelles il est exposé. Un taux de mortalité plus élevé a tout de même été mesuré dans les TMDF comparativement aux PCLS, même si cette différence n'est pas significative (le résultat au test-t non pairé vaut 0,066). La mortalité mesurée après une heure peut être attribuée, au moins en partie, au stress causé sur la surface du tissu par la procédure de coupe. À cause d'un ratio de surface sur volume plus important pour les TMDF (environ 1,5 fois supérieur pour une tranche de 250 µm d'épais), il n'est pas surprenant de constater une mortalité plus élevée au premier point d'analyse.

Ces résultats peuvent aussi être comparés aux résultats précédents obtenus par van Midwoud *et al*. (*Figure A.5*, [84]) dans le même laboratoire en 2010. On remarque d'abord que les taux de sécrétion après la période de pré-incubation étaient plus bas pour les expériences de 2010. Aussi, des taux plus faibles avaient été mesurés après quatre heures d'incubation comparativement

aux résultats de nos expériences. Malgré les efforts à reproduire les mêmes conditions expérimentales, il semble qu'il y ait eu des différences d'exécution ou des différences intrinsèques au tissu étudié entre les deux groupes d'expérience ayant conduit à des résultats sensiblement différents. Cela montre bien l'importance d'avoir répété les mesures de sécrétion pour les PCLS dans la plaque à 12 puits pour établir une base de comparaison juste entre les deux techniques d'incubation étudiées (TMDF dans les microsystèmes et PCLS dans une plaque à 12 puits).

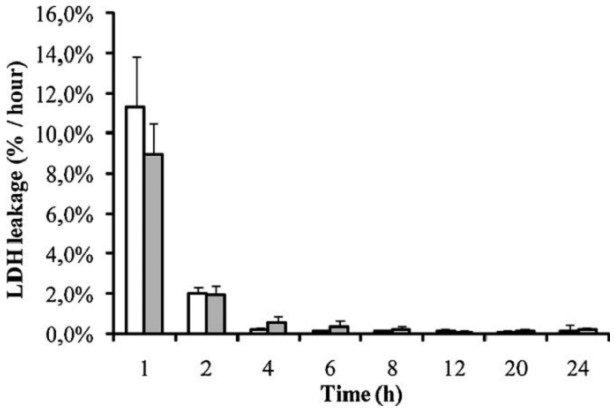


Figure A.5: Taux de sécrétion de LDH en fonction du temps pour des PCLS d'expériences antérieures. Figure reproduite de la référence [84] avec l'autorisation de l'éditeur. Les PCLS ont été incubées soit dans une plaque à 12 puits (barres blanches), soit dans un système avec perfusion intégrée (barres grises). Les barres d'erreur indiquent ± l'erreur type sur la moyenne de trois expériences indépendantes.

Enfin, la mesure de la LDH dans le milieu entourant les échantillons de tissu nous a permis de constater qu'il n'y a pas de différence significative de survie entre les PCLS dans une plaque à 12 puits agitée et les TMDF dans les microsystèmes non perfusés. Toutefois, une tendance non significative de mortalité plus élevée a été notée après une heure d'incubation des TMDF qui peut s'expliquer par le fait qu'une plus grande proportion de l'échantillon a été exposé à la procédure de coupe à cause d'un ratio surface/volume plus important pour les TMDF.

A.2.1.2 Microscopie confocale

Les TMDF ont aussi pu être imagées par microscopie confocale à deux reprises. Ces résultats sont compilés à la *Figure A.6* (*A*).

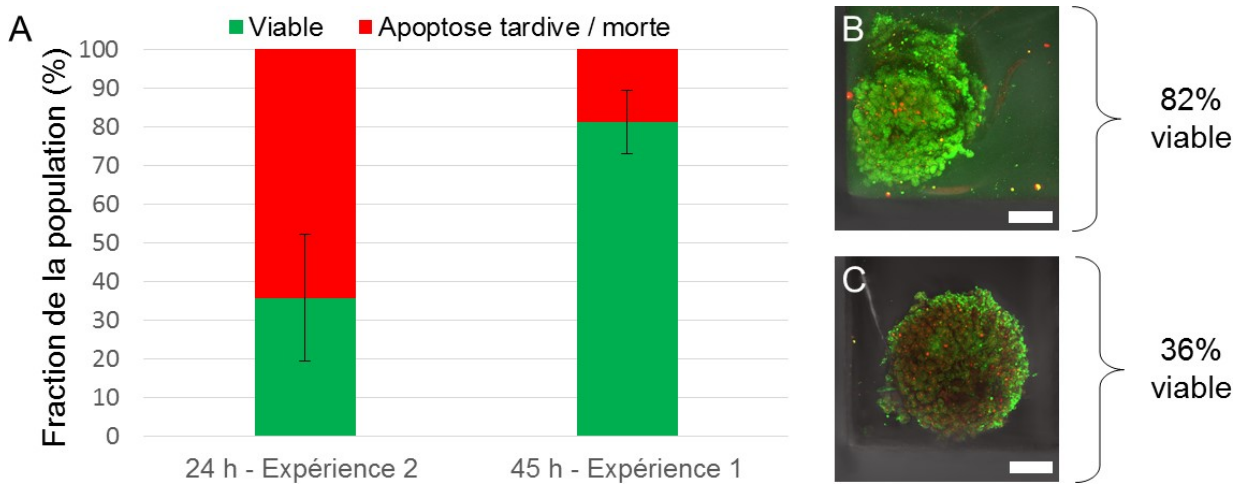


Figure A.6: Viabilité des TMDF après 24 et 45 heures d'incubation, mesurée par microscopie confocale sur les échantillons marqués à la calcéine AM et au PI. A) Résultat de l'analyse d'images faite par l'algorithme de segmentation pour deux expériences indépendantes, chacune comportant 10 TMDF. Les barres d'erreur indiquent ± l'écart-type de la moyenne des 10 TMDF. B-C) Projections maximales de séquences d'images représentatives de l'expérience 1 après 45 h d'incubation (B) et de l'expérience 2 après 24 h d'incubation (C) et scores de viabilité associés. Les images utilisées pour produire cette figure ont été acquises au Centre de microscopie de l'UMCG subventionné par NWO-grant 175-010-2009-023.

Selon les résultats de LDH, des mortalités cumulatives moyennes d'environ 55% et 70% étaient attendus après 24 heures et 45 heures, respectivement. Or, les résultats de microscopie confocale ne sont pas très consistants avec ces attentes. Une viabilité anormalement élevée de 81 ± 8% (moyenne ± écart-type) a été obtenue lors de la première expérience, analysée après 48 heures d'incubation. À l'opposé, une viabilité plutôt faible de 36 ± 16% a été obtenue lors de la seconde expérience (indépendante de la première), analysée après 24 heures d'incubation. Notons que la mortalité cumulative moyenne trouvée par le test LDH représente des résultats individuels assez étalés, dont certains recoupent avec les deux expériences de microscopie montrées à la *Figure A.6* (A). Ces expériences ont été effectuées avec le tissu de deux rats différents, et malheureusement, la sécrétion de LDH n'a été mesurée pour aucune d'entre elles. Aussi, le microscope confocal n'image que la couche inférieure des TMDF jusqu'à une profondeur d'environ 40 µm, alors une importante portion des échantillons ne sont pas représentés dans ces résultats. Enfin, lors de la seconde expérience, la procédure de coupe était enseignée à un nouvel utilisateur, ce qui a pu introduire des erreurs de manipulation conduisant à une viabilité plus faible.

Il serait important d'identifier les sources de la variabilité qui peuvent résider dans la qualité initiale du tissu de foie, les conditions auxquelles il est exposé (température, concentration d'oxygène, type de milieu) pendant la procédure coupe, le temps entre la récolte du tissu et l'initiation de l'incubation, etc. En effet, les résultats de la première expérience après 45 heures d'incubation seraient très prometteurs s'ils pouvaient être reproduits.

Les résultats de viabilité calculés par l'algorithme de segmentation des images fluorescentes correspondent très bien à ce qui est observé visuellement en examinant les images acquises au microscope. Des exemples de projections maximales du signal et des résultats correspondants de viabilité sont montrés aux sous-figures *B* et *C* de la *Figure A.6*.

Pour conclure, les quelques résultats de microscopie confocale acquis pour le tissu de foie ont témoigné de la variabilité des échantillons de différentes expériences en termes de viabilité. La technique a tout de même permis de mesurer toute une gamme de viabilités allant de 17% à 90% à travers les deux expériences et de valider l'applicabilité de l'algorithme de calcul de viabilité pour ces images. Le signal élevé, uniforme et non dispersé des cellules ainsi que la très faible autofluorescence aux intensités employées a permis à l'algorithme de performer sans faille.

A.2.1.3 Microscopie à deux photons

La microscopie à deux photons a été étudiée comme technique alternative à la microscopie confocale pour imager plus profondément dans le tissu de foie. Toutefois, les conditions optimales d'excitation et de détection des marqueurs fluorescents (calcéine AM et PI) n'ont pas pu être trouvées avec certitude.

Néanmoins, ces expériences ont permis d'imager avec succès à travers un système microfluidique modifié dont la couche supérieure était composée d'une lamelle de verre. Pour la première fois, les échantillons ont été imagés par le haut à travers une lamelle de verre en utilisant un microscope droit multiphotonique.

Dans un premier temps, la profondeur d'imagerie a été évaluée en excitant l'échantillon à 830 nm. À cette longueur d'onde, des signaux intenses dans le vert et le rouge étaient détectés, laissant croire qu'il pourrait s'agir des fluorophores d'intérêt (calcéine AM et PI). Or, tel que confirmé plus tard en imageant le tissu non marqué, le signal vert détecté à cette longueur d'onde ne provenait pas de la calcéine AM. Tel que montré à la *Figure A.7*, cette première acquisition a

tout de même permis de constater que la profondeur d'imagerie était doublée à environ 100 µm par rapport à celle de la microscopie confocale.

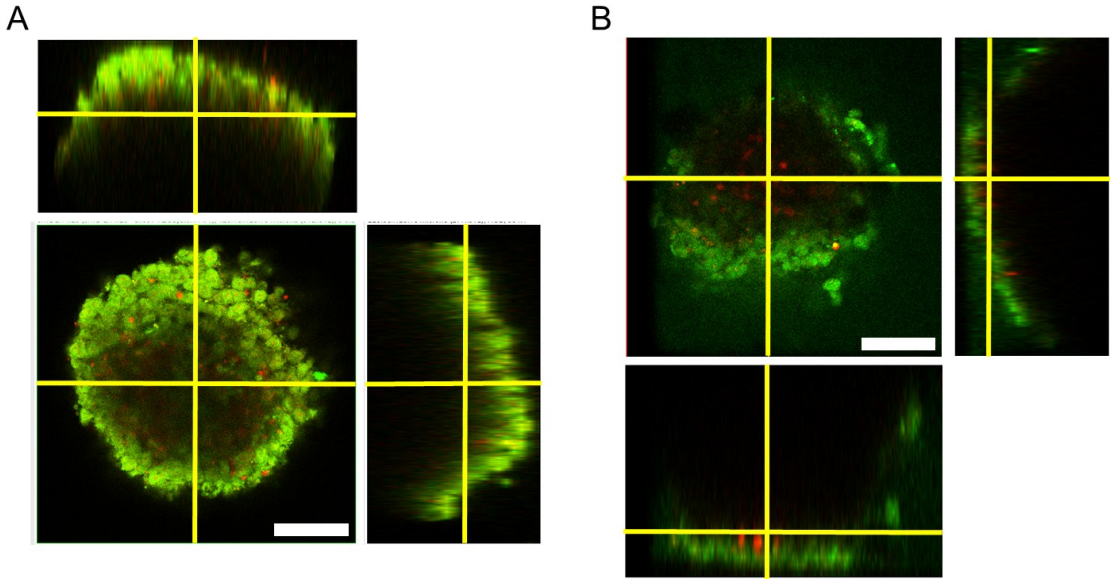


Figure A.7: Comparaison de la profondeur d'imagerie de la microscopie à deux photons par rapport à celle de la microscopie confocale. Image d'une section optique et des deux coupes orthogonales de l'endroit indiqué par la croix jaune pour la microscopie multiphotonique (excitation à 830 nm, imagerie par un système droit) (A) et pour la microscopie confocale (imagerie par un système inversé) (B). Barres d'échelle = 100 µm. Les images utilisées pour produire cette figure ont été acquises au Centre de microscopie de l'UMCG subventionné par NWO-grant 175-010-2009-023.

La prochaine étape consistait à imager une TMDF non marquée en l'excitant à diverses longueurs d'onde pour valider l'absence de signaux pouvant contaminer le signal fluorescent d'intérêt. La *Figure A.8* montre les signaux récoltés lorsque le tissu était excité à différentes longueurs d'onde allant de 780 à 1000 nm. Étonnamment, un signal a été détecté sur une large plage de longueurs d'onde allant de 780 à 940 nm. Ce signal pourrait être dû à l'autofluorescence du tissu ou à un autre processus optique non linéaire se produisant dans l'échantillon, tel que la génération de seconde harmonique. Toutefois, puisque la génération de seconde harmonique se fait exactement à la moitié de la longueur d'onde d'excitation et que ce type de signal se propage généralement vers l'avant, il est impossible que le signal capté en epi-collection dans le filtre de 500 à 550 nm soit de cette origine [80]. Il est beaucoup plus probable que le signal détecté soit

l'autofluorescence du tissu qui devient détectable grâce aux détecteurs ultra-sensibles utilisés en microscopie à deux photons.

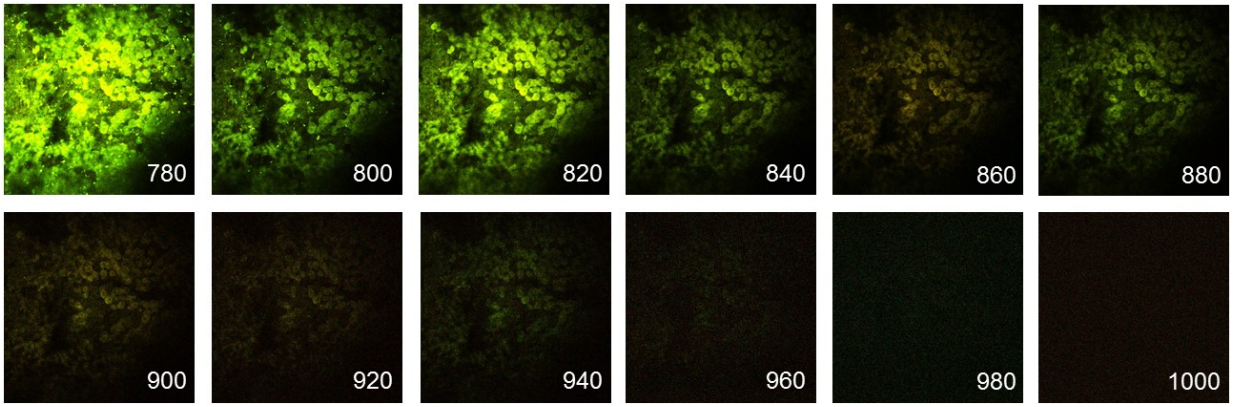


Figure A.8: Images d'un échantillon de tissu de foie non marqué, excité à différentes longueurs d'onde allant de 780 à 1000 nm. Signaux captés de 500 à 550 nm (vert) et de 575 à 610 nm (rouge). Les longueurs d'onde d'excitation sont indiquées sur chaque image (en nm). Les images utilisées pour produire cette figure ont été acquises au Centre de microscopie de l'UMCG subventionné par NWO-grant 175-010-2009-023.

Donc seule la plage de 960 à 1000 nm restait disponible pour exciter les échantillons en minimisant le signal d'autofluorescence du tissu. Un signal vert, correspondant possiblement au signal de la calcéine AM, a finalement été mesuré dans l'échantillon marqué en l'excitant à 960 nm (*Figure A.9* (*A*)). Par contre, aucun signal rouge n'a été détecté à cette longueur d'onde. En se référant à la *Figure A.8*, on constate qu'il y a très peu de signal de contamination rouge aux longueurs d'onde testées. L'échantillon marqué de la *Figure A.7* imagé à 830 nm montrait pourtant du signal rouge s'apparentant au signal de PI détecté au microscope confocal. Il se pourrait donc que le PI puisse être excité à 830 nm. Cependant, ni l'excitation à 960 nm pour la calcéine AM, ni l'excitation à 830 nm pour le PI ne sont en accord avec les spectres d'excitation à deux photons trouvés dans la littérature (*Figure A.3*, [82]), ce qui donne peu de confiance en ces paramètres d'imagerie.

Cette expérience a aussi permis de constater que les TMDF piégés dans le système microfluidique étaient bien plus simples à imager qu'une PCLS complète posée dans un pétri. D'abord, chaque TMDF imagé était complètement contenu dans le champ de vue des objectifs 20X et 32X utilisés, permettant d'en faire l'acquisition complète sans bouger l'échantillon. Aussi,

puisque le TMDF se trouvait dans un système fermé indépendant du liquide d'immersion, la position du tissu n'était pas affectée par les mouvements du microscope pendant la recherche d'une zone d'intérêt et pendant l'acquisition (*Figure A.9*).

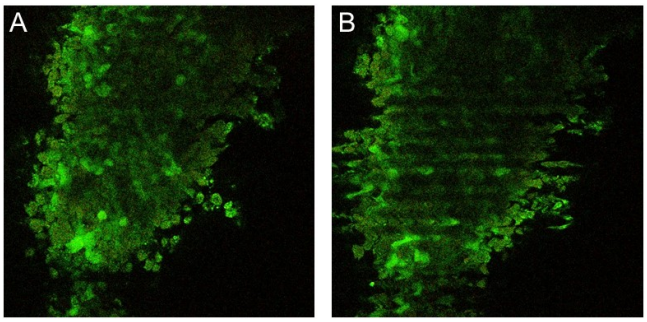


Figure A.9: Effet du mouvement sur la qualité de l'image. A) Image d'une PCLS acquise sans mouvement du tissu (excitation à 830 nm). B) Image d'une PCLS avec des artéfacts de mouvement causés par le déplacement de la tranche dû au mouvement de l'objectif. Les images utilisées pour produire cette figure ont été acquises au Centre de microscopie de l'UMCG subventionné par NWO-grant 175-010-2009-023.

Enfin, en poursuivant l'optimisation des paramètres d'imagerie et peut-être en choisissant des fluorophores différents, cette technique pourrait doubler la profondeur d'imagerie du tissu jusqu'à au moins 100 µm. Ceci permettrait de se rapprocher du centre de l'échantillon et d'avoir une meilleure représentation de la distribution spatiale de la viabilité en fonction de la profondeur.

A.2.2 État métabolique

En plus de l'évaluation de la viabilité, le métabolisme des TMDF a été analysé lors des expériences menées à Groningue. Dans une expérience préliminaire, les métabolites formés par la biotransformation de la 7-EC et de la 7-HC ont été mesurés par chromatographie en phase liquide à haute précision (CLHP) dans le milieu extrait des microsystèmes après deux heures d'incubation avec ces xénobiotiques.

A.2.2.1 Chromatographie en phase liquide à haute précision pour la détection de métabolites de la 7-EC et de la 7-HC

A.2.2.1.1 Métabolisme de phase I

Notre tentative à mesurer le métabolisme de phase I dans le milieu extrait des microsystèmes après incubation avec la 7-EC n'a pas été fructueuse, car les métabolites n'étaient présents qu'à faibles concentrations. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce résultat. Premièrement, la conversion du 7-EC en 7-HC se fait à un rythme relativement lent [86], puis ce métabolite peut ensuite être converti en les métabolites de phase II. Seulement de faibles concentrations de tous les métabolites (7-HC, 7-HC-G et 7-HC-S) se trouvent donc dans le milieu, ce qui les rend difficiles à détecter. En plus, l'activité de l'enzyme responsable de ce métabolisme de phase I est graduellement perdue au cours des 24 premières heures d'incubation *in vitro* [87]. Il a tout de même été possible de mesurer le métabolisme de phase I dans le milieu entourant les PCLS incubées dans une plaque à 12 puits, tel que précédemment montré [55], [86], [87]. Cette différence de détection pourrait simplement être due à la limite de détection de l'instrument qui aurait été atteinte pour les échantillons de milieu provenant des systèmes. En effet, ceux-ci étaient environ 1,5 fois plus dilués que ceux provenant des plaques à 12 puits (25 fois moins de tissu, mais seulement 17 fois moins de milieu récolté). Par la suite, le seuil d'analyse des pics d'absorbance a été réduit pour que l'instrument détecte les plus petits pics associés à des concentrations plus faibles de métabolites, mais le temps n'a pas permis de vérifier si cela aurait aidé à détecter le métabolisme de phase I avec les conditions expérimentales décrites ici.

Pour augmenter les chances d'obtenir des concentrations détectables de métabolites, la concentration de la substance 7-EC aurait pu être augmentée à 500 µM ou le métabolisme d'une autre substance, telle la testostérone, aurait pu être étudié.

A.2.2.1.2 Métabolisme de phase II

Le métabolisme de phase II a été évalué pour les PCLS et pour les TMDF incubés dans la plateforme microfluidique en détectant les métabolites 7-HC-G et 7-HC-S après une incubation avec 200 µM de 7-HC. Tel que montré à la *Figure A.10*, les résultats pour les TMDF dans les systèmes sont très similaires à ceux des PCLS dans la plaque à 12 puits, sauf pour la 7-HC-S qui a été métabolisée à un rythme plus faible dans les microsystèmes lors du première période

d'incubation de deux à quatre heures. Il se peut que cela soit dû à des erreurs expérimentales, puisque les valeurs mesurées à la seconde période d'incubation de 21 à 23 heures sont redevenues similaires à celles des PCLS cultivées dans la plaque à 12 puits.

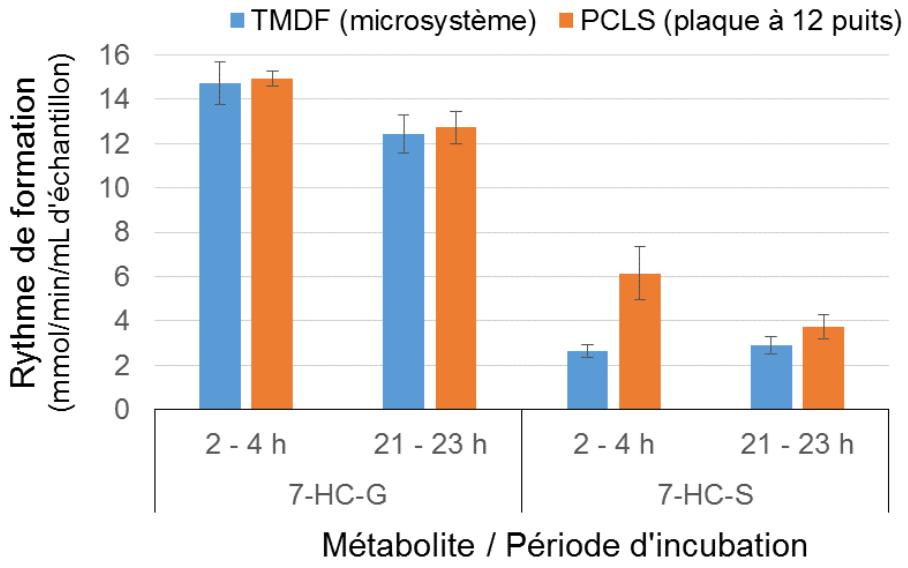


Figure A.10: Rythme de formation des métabolites de la 7-HC à différentes périodes d'incubation pour des TMDF dans les microsystèmes ou pour des PCLS dans une plaque à 12 puits. Les barres d'erreur montrent ± l'écart-type de quatre mesures d'une même expérience.

Enfin, ces résultats préliminaires nous portent à croire que la plus petite taille des TMDF n'affecte pas leur capacité métabolique de phase II. Quant au métabolisme de phase I, les conditions expérimentales devraient être modifiées pour améliorer la détection des métabolites par CLHP.

Il peut donc être conclu de ces résultats de stage que les échantillons de foie peuvent être coupés et cultivés dans la plateforme microfluidique développée. Les résultats ont permis de valider que la viabilité des TMDF peut être déterminée par la détection du biomarqueur de mortalité LDH ou par microscopie confocale des tissus marqués avec des fluorophores de viabilité. Différentes techniques d'analyse qui pourraient être utiles à l'étude des micro-fragments de tissu cancéreux ont aussi été explorées. En particulier, le test LDH a été adapté aux échantillons de tumeur cultivés au CRCHUM après le stage. De plus, la technique de CLHP, possiblement couplée à un spectromètre de masse pour plus d'information sur la composition chimique des substances sortant de la colonne, pourrait être employée pour détecter des protéines particulières sécrétées par le tissu tumoral. Une fois optimisée, la microscopie à deux photons aiderait, quant à elle, à imager plus profondément dans le tissu et à éventuellement déterminer la distribution spatiale des cellules viables et mortes à travers le tissu.