

Titre: Les réseaux de chambres de culture de sphéroïdes : un outil pour la recherche de traitements combinatoires en oncologie
Title: research of combinatory treatments in oncology

Auteur: Alexandre R. Brunet
Author:

Date: 2018

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: R. Brunet, A. (2018). Les réseaux de chambres de culture de sphéroïdes : un outil pour la recherche de traitements combinatoires en oncologie [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/3027/>

Document en libre accès dans PolyPublie Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/3027/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Thomas Gervais, & Philip Wong
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

LES RÉSEAUX DE CHAMBRES DE CULTURE DE SPHÉROÏDES : UN OUTIL POUR LA
RECHERCHE DE TRAITEMENTS COMBINATOIRES EN ONCOLOGIE

ALEXANDRE R. BRUNET

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

MARS 2018

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

LES RÉSEAUX DE CHAMBRES DE CULTURE DE SPHÉROÏDES : UN OUTIL POUR LA
RECHERCHE DE TRAITEMENTS COMBINATOIRES EN ONCOLOGIE

présenté par : R. BRUNET Alexandre

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

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

M. MEUNIER Michel, Ph. D., président

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

M. WONG Philip, MD, membre et codirecteur de recherche

M. THERRIAULT Daniel, Ph. D., membre

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les personnes qui, tout au long de ce travail, m'ont apporté leur soutien tant d'un point de vue émotif, qu'organisationnel, matériel et créatif.

Je remercie d'abord ma compagne, Rubis Lafortune, et l'ensemble de ma famille qui m'ont soutenu tout au long de ces travaux et qui m'ont apporté un soutien inconditionnel et sans faille, m'encourageant toujours à persévéérer, malgré les longues journées passées loin d'eux et les longues nuits passées à travailler.

Je remercie aussi Thomas Gervais et Philip Wong de m'avoir guidé tout au long de cette aventure, bien qu'il ne fût pas toujours aisé de réviser les travaux que j'écrivasse. Je les remercie aussi de m'avoir donné l'opportunité de parfaire mes connaissances dans les domaines de la microfluidique et de l'oncologie en tant que membre de leurs équipes pour plus de deux années et des nombreuses opportunités qu'ils m'ont fournies afin de faire connaitre mes travaux.

J'ai grandement apprécié les nombreuses interactions avec les membres des équipes de ces deux chercheurs et le climat convivial qui y régnait, permettant toujours de questionner mes collègues sur les meilleurs moyens de résoudre tel ou tel problème et inversement, d'ouvrir mon esprit en tentant de résoudre des problèmes qui divergeaient du cadre de mon projet. Je remercie Simon Guichandut et l'équipe de Polytechnique Montréal pour leur soutien au volet théorique et expérimental de ce projet. Je remercie particulièrement Pierre-Alexandre Goyette qui, étant mon voisin de bureau, était généralement la première personne à qui je faisais part de mes succès et de mes échecs, partageant ma joie pour les uns et m'aidant à trouver des solutions aux autres.

Je remercie Julie Lafontaine, Amélie St-Georges-Robillard, Frédérique Labelle ainsi que tous les autres membres de l'équipe de CRCHUM qui ont grandement contribué à l'avancement du volet biologique de ce projet. Je remercie aussi Amélie St-Georges-Robillard pour l'enseignement de plusieurs techniques fondamentales à ce projet ainsi que pour les nombreuses formations qui m'ont permis d'utiliser au mieux les différents appareils du laboratoire.

Finalement, je tiens à remercier l'Institut du Cancer de Montréal pour son soutien financier tout au long de ce projet par le biais de la bourse Canderel.

RÉSUMÉ

Le traitement du cancer requiert fréquemment la combinaison de plusieurs traitements tels la chimiothérapie et la radiothérapie afin d'accroître les chances de survie des patients. L'efficacité de ces combinaisons repose sur les synergies entre les traitements et varie grandement en fonction de la nature du cancer ciblé et des traitements utilisés. Or, il n'existe peu ou pas d'outils spécialisés compatibles à la radiothérapie permettant de tester rapidement ces combinaisons en laboratoire. Nous avons donc développé un dispositif microfluidique composé d'un réseau de valves permettant la réalisation de 12 combinaisons et la culture de sphéroïdes, des agrégats cellulaires tridimensionnels formés d'un ou de plusieurs types de cellules.

Le dispositif est composé d'un assemblage d'étages de PDMS, un matériau flexible, transparent et perméable à l'oxygène, et est réalisé à partir de moules fabriqués par impression 3D, permettant la réalisation de plusieurs itérations du dispositif rapidement et à moindre cout. Le dispositif devant être simple à utiliser, compatible aux techniques de culture cellulaire conventionnelles, nous avons conçu des valves magnétiques manuelles afin de pouvoir contrôler le flux des liquides dans le système. Chacune de ces valves peut être contrôlée manuellement et individuellement, conférant un haut degré de flexibilité au dispositif. Elles résistent aussi à des pressions élevées ($> 10 \text{ kPa}$), même après une exposition à une dose de radiothérapie de 8 Gy et une incubation de 7 jours à 37°C.

Le dispositif final, le réseau de chambres de culture de sphéroïdes (RCCS), est composé de 12 chambres de cultures contenant chacune 25 puits où peuvent se former les sphéroïdes. Chaque chambre de culture est entourée de quatre valves, ce qui permet de contrôler précisément le trajet emprunté par les solutions à l'intérieur du dispositif. En ajustant les valves, il est possible de remplir le RCCS en entier à partir d'une entrée et d'une sortie ou de faire circuler les solutions en empruntant seulement les canaux horizontaux ou verticaux. Les chambres de culture sont aussi séparées les unes des autres de plusieurs millimètres, ce qui permet d'exposer les différentes chambres d'un même dispositif à différentes doses de radiothérapie. Les RCCS ont permis la formation et l'imagerie des sphéroïdes provenant de trois lignées cellulaires différentes directement sur le dispositif. Il reste encore à évaluer leur potentiel dans un contexte réel de recherche de traitements combinatoires en oncologie, mais il ne fait aucun doute qu'une fois ces résultats obtenus, les RCCS pourraient devenir un outil clé pour la recherche en oncologie.

ABSTRACT

Cancer treatment frequently needs a combination of several treatments such as chemotherapy and radiotherapy in order to increase patients' survival rates. Efficacy of these combinations relies on synergies between treatments and varies greatly in function of the nature of the targeted cancer and the treatments used. However, very few specialized tools exist that allow rapid testing of these combinations in laboratory, while being compatible to radiotherapy. Hence, we developed a microfluidic device composed of an array of valves allowing simultaneous testing of twelve combinations of treatments and culture of spheroids, tridimensional cell aggregates composed of one or more type of cells.

The device is composed of an assembly of layers of PDMS, a flexible, transparent and oxygen permeable material. The layers were made from 3D printed molds, allowing cheap and adaptable fabrication of the device according to the different needs. In order for the device to be simple to use and compatible to day to day cell culture techniques, we designed manual magnetic valves to route liquids within the system. Each of these valves can be opened and closed manually, resulting in a high degree of flexibility. They also resist high pressures (> 10 kPa), even after being exposed to 8 Gy radiotherapy and incubated 7 days at 37°C.

The final device, the spheroid culture chamber array (SCCA), is composed of 12 culture chambers each containing 25 wells where spheroids can form. Four valves, allowing precise control of solutions pathways within the device, surround each culture chamber. By adjusting the valves configuration, it's possible to fill the entire device from a single inlet and outlet or to fill only the vertical or horizontal channels. The culture chambers are also separated by several millimeters, which allows exposure of the different chambers to different radiotherapy doses on a single device. SCCA allowed formation and imaging of spheroids from three different cell lines directly on-chip. The potential of the device in a real oncology combinatorial experiment still remains to evaluate, but there is no doubt that, once there experiments will be done, SCCAs could become a key tool in oncology research.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	IV
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XI
LISTE DES ANNEXES	XII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Description de la problématique	1
1.2 Objectifs de recherche.....	6
1.3 Organisation du mémoire.....	8
1.4 Contribution de l'auteur.....	9
CHAPITRE 2 FABRICATION	11
2.1 Matériaux	11
2.2 Impression 3D	14
2.2.1 Historique.....	14
2.2.2 Conception	17
2.2.3 Impression.....	20
2.2.4 Préparation au moulage.....	21
2.3 Moulage	24
2.4 Assemblage	25
CHAPITRE 3 VALVES	27

3.1 Types de valves.....	27
3.2 Valves manuelles pneumatiques	30
3.3 Valves magnétiques manuelles	31
3.3.1 Fonctionnement.....	31
3.3.2 Design et fabrication	32
3.3.3 Résistance	35
CHAPITRE 4 RÉSEAU DE CHAMBRES DE CULTURE DE SPHÉROÏDES.....	45
4.1 Design	45
4.1.1 RCCS	45
4.1.2 Autres composantes	52
4.2 Préparation	54
4.3 Routage	55
4.4 Culture cellulaire.....	58
CHAPITRE 5 SYNTHÈSE.....	61
5.1 Retour sur les principaux résultats et les objectifs	61
5.1.1 Fabrication	61
5.1.2 Résistance des valves	62
5.1.3 Réseau de chambres de culture de sphéroïdes	64
5.2 Applications futures	64
5.3 Améliorations possibles	65
CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	68
BIBLIOGRAPHIE	69
ANNEXES	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Description des matériaux utilisés en microfluidique.....	12
Tableau 2.2 : Description des techniques de fabrication de moules en microfluidique [20,25]....	13
Tableau 2.3 : Caractéristiques des différents types d'imprimantes 3D [22,23,25,27].....	16
Tableau 2.4 : Moulages de PDMS après recouvrement de la surface du moule	23
Tableau 2.5 : Module de Young du PDMS.....	24
Tableau 3.1 : Comparaison des valves actives et manuelles	27
Tableau 3.2 : Résistance des valves à la pression en fonction de la forme du canal	35
Tableau 4.1 : Données théoriques de l'analyse de l'expérience de routage	52
Tableau 4.2 : Problèmes et solutions des différentes versions du dispositif lors des expériences de routage.....	56
Tableau 4.3 : Résultats culture cellulaire.....	60

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Exemple de courbe de croissance cellulaire avec et sans synergie	2
Figure 1.2 : Comparaison des modèles utilisés en recherche	3
Figure 1.3 : Principaux modes de formation de sphéroïdes.....	4
Figure 2.1 : Principaux modes d'impression 3D	15
Figure 2.2 : Articles publiés sur l'impression 3D et la microfluidique	15
Figure 2.3 : Cible de résolution pour l'Asiga Freeform Pico	18
Figure 2.4 : Différentes étapes de la stéréolithographie inversée et règles de design	19
Figure 2.5 : Moule fixé à une plaque de PMMA	20
Figure 2.6 : Différents recouvrement de moules	22
Figure 2.7 : Processus de fabrication et d'assemblage d'une valve magnétique manuelle	26
Figure 3.1 : Schéma des valves manuelles.....	28
Figure 3.2 : Moules et assemblage de valves pneumatiques	30
Figure 3.3 : Design des valves magnétiques manuelles.....	31
Figure 3.4 : Diagramme des forces s'appliquant au niveau de la membrane	32
Figure 3.5 : Types de tiges ferromagnétiques	34
Figure 3.6 : Procédure de test de résistance des valves	38
Figure 3.7 : Ensemble des facteurs affectant la résistance des valves à la pression	39
Figure 3.8 : Résistance en fonction du type de tige ferromagnétique utilisée	40
Figure 3.9 : Influence du temps d'incubation sur la résistance des valves	41
Figure 3.10 : Influence de la RT sur la résistance des valves	42
Figure 3.11 : Influence de l'état des valves pendant l'incubation sur la résistance des valves	43
Figure 3.12 : Image en fluorescence de la diffusion de fluorescéine à travers les valves	44
Figure 4.1 : Premier design de RCCS.....	47

Figure 4.2 : Deuxième design de RCCS	48
Figure 4.3 : Troisième design de RCCS	50
Figure 4.4 : Réseau de Halbach	53
Figure 4.5 : Différents types de plaques d'aimants utilisées	54
Figure 4.6 : Expériences de routage pour les deux premiers designs	57
Figure 4.7 : Expérience de routage du 3 ^e design.....	58
Figure 5.1 : Modes de fabrication alternatifs	66

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

CT	Chimiothérapie
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PDMSm	PDMS magnétique
PMMA	Polyméthymétacrylate
RCCS	Réseau de chambres de culture de sphéroïdes
RT	Radiothérapie
TC	Traitements combinatoires

LISTE DES ANNEXES

Annexe A – Données brutes des résultats de résistance des valves à la pression..... 75

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Description de la problématique

Depuis le milieu du vingtième siècle, la médecine moderne s'est principalement axée sur le développement de nouveaux médicaments afin de traiter l'ensemble des maladies qui nous touchent. Pour y parvenir, l'industrie pharmaceutique débourse plus de deux milliards et demi de dollars par nouveau médicament sur une période allant de 10 à 17 ans [1,2]. Ces couts et ces délais élevés s'expliquent par les nombreuses phases précliniques et cliniques nécessaires à l'approbation des médicaments par les instances de santé publique, le tout afin d'assurer le bien-être de la population. De récents travaux [3,4] semblent toutefois indiquer que des médicaments homologués pour un certain usage pourraient aussi être utiles pour le traitement d'autres maladies. Cette tendance, appelée le repositionnement de médicaments, permet de diminuer grandement les couts et le temps requis pour l'approbation par les instances de santé publique, le temps requis pouvant diminuer de 5 à 10 ans [3]. Afin d'encourager de telles initiatives, le NCATS (National Center for Advancing Translational Sciences), un sous organisme du NIH (National Institute of Health), a d'ailleurs mis sur pied un programme dédié au repositionnement de médicaments.

Le repositionnement peut aussi être utilisé pour la recherche de traitements combinatoires (TC) qui se basent sur la recherche d'effets synergiques entre des médicaments afin de mieux guérir des maladies. Les TC possèdent un fort potentiel dans le domaine de l'oncologie où la grande hétérogénéité des cancers rend complexe l'utilisation de médicaments uniques pour le traitement de la maladie [4]. Ainsi, en alliant des techniques conventionnelles de traitement, telles la chirurgie, la radiothérapie (RT) et la chimiothérapie (CT), qui éliminent les cellules de manière non-spécifique et certains médicaments adressant spécifiquement les cellules cancéreuses, il serait possible d'augmenter l'efficacité de certains traitements ou d'en diminuer les effets secondaires [4,5]. Ce type d'interaction repose sur le principe de synergie qui signifie que l'utilisation de deux traitements A et B dont l'efficacité séparée serait respectivement de a et b possèdent, lorsque combinés, une efficacité c plus grande que la somme de a et b (Figure 1.1). C'est le cas de l'acide valproïque, un médicament homologué pour le traitement de l'épilepsie et des migraines qui, lorsqu'administré seul peut inhiber la prolifération des tumeurs, mais peut difficilement les éliminer complètement [4,6]. L'acide valproïque a aussi un effet

radiosensibilisant, ce qui signifie qu'en le combinant avec des traitements de RT, il est possible d'obtenir un traitement plus efficace que lorsque les deux sont utilisés séparément.

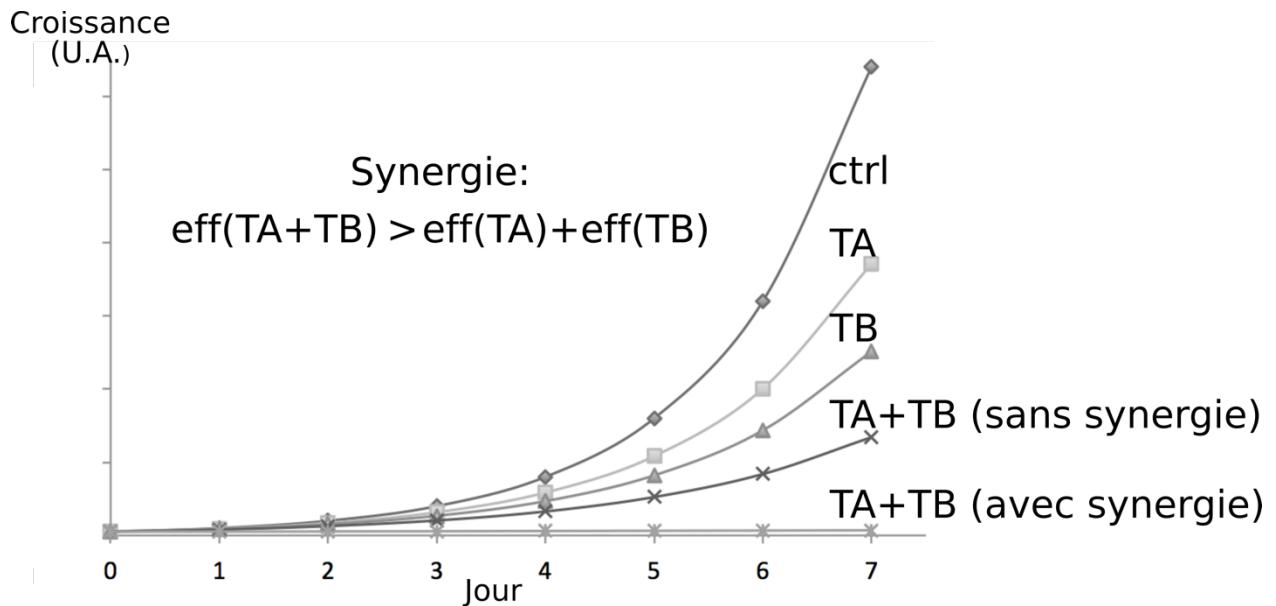


Figure 1.1 : Exemple de courbe de croissance cellulaire avec et sans synergie

L'un des principaux inconvénients des TC est le fait que les interactions observées varient grandement en fonction des médicaments utilisés et de la nature des maladies étudiées. Ainsi, il est possible qu'une combinaison ayant un effet synergétique sur une certaine souche cancéreuse n'ait aucun effet sur une autre souche [7], ce qui rend la recherche de telles combinaisons laborieuse. Ce projet vise donc l'amélioration des outils disponibles pour l'étude des TC en raison du fort potentiel de cette technique et de la contribution que des progrès au niveau de l'infrastructure de ces essais pourraient apporter et de leurs répercussions possibles sur le monde médical. Pour ce faire, l'utilisation de plusieurs technologies est nécessaire afin de fournir un outil flexible permettant d'étudier rapidement plusieurs combinaisons de traitements, tout en représentant le mieux possible l'environnement du corps humain.

La première de ces technologies est l'utilisation de cultures cellulaires en 3D plutôt que l'emploi de cultures en 2D. Dans le passé, le choix d'utiliser les cultures en 2D comme première étape de dépistage dans la recherche de molécules a été fait principalement à cause de la facilité avec laquelle elles peuvent être cultivées et imagées (Figure 1.2) [8]. Toutefois, les progrès réalisés en imagerie, qui rendent désormais possible la réalisation et l'imagerie des cultures cellulaires en 3D ont causé un regain d'intérêt de la communauté scientifique pour ce type de culture [9]. Elles représentent plus adéquatement l'environnement du corps humain que les

cultures en 2D qui simplifient souvent de manière inadéquate l'environnement du corps humain, notamment parce qu'elles ne présentent pratiquement que des interactions cellules-milieu ou cellules-substrat, négligeant les interactions cellules-cellules [8,9]. De plus, lors de la croissance de structures en 3D, l'apport nutritionnel et métabolique de chaque cellule variant en fonction de sa position, une différenciation cellulaire induite par ces gradients peut s'effectuer, de manière similaire à ce qui se passe à l'intérieur du corps humain [9]. L'utilisation de cultures cellulaires en 3D permettrait donc d'obtenir des résultats plus près de la réalité du corps humain, justifiant leur utilisation pour les tests *in vitro*.

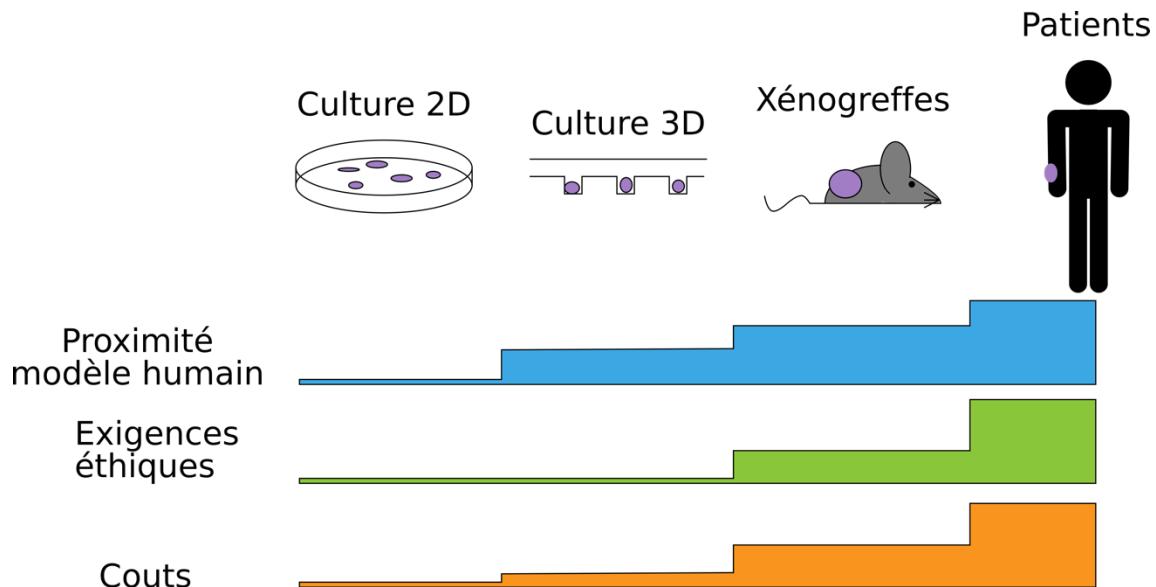


Figure 1.2 : Comparaison des modèles utilisés en recherche

L'obtention de cultures en 3D peut s'effectuer de plusieurs manières, les plus répandues étant celles fonctionnant sur la base de l'agrégation de cellules provenant d'une suspension cellulaire. Une fois les cellules agrégées, elles forment une structure appelée sphéroïde dont il est possible d'observer la croissance. Les méthodes les plus répandues pour les former sont : l'utilisation d'une préparation riche en matrice extracellulaire, des gouttelettes suspendues ou d'un dispositif microfluidique (Figure 1.3) [8].

L'utilisation de préparation riche en matrice extracellulaire (Figure 1.3 A) est une technique qui se base sur l'adhérence des cellules à cette dernière afin de former la structure 3D [8]. Cette technique permet la formation de sphéroïdes à partir de pratiquement n'importe quelle lignée cellulaire [10], mais nécessite l'utilisation de techniques plus complexes et de matériel plus



Figure 1.3 : Principaux modes de formation de sphéroïdes

(A) Utilisation d'une préparation riche en matrice extracellulaire (rose), (B) formation par gouttelettes suspendues et (C) formation à l'aide d'un système microfluidique.

couteux que les deux autres. L'utilisation de ce type de préparation peut aussi donner lieu à la formation de sphéroïdes peu compacts ou à de faux sphéroïdes où les cellules sont seulement présentes sur les parois de la préparation, diminuant considérablement les interactions intercellulaires. La technique des gouttelettes suspendues (Figure 1.3 B) repose sur la force gravitationnelle afin de causer une accumulation de cellules à l'interface entre le milieu cellulaire et l'air. Pour ce faire, des gouttelettes d'une suspension cellulaire sont déposées soit dans une plaque à trous qui est ensuite renversée rapidement [8], soit dans un dispositif spécialement conçu à cet effet [11]. Cette technique permet l'obtention de sphéroïdes de taille régulière, mais le changement de milieu cellulaire y est complexe à cause de la fragilité de la gouttelette qui risque de tomber si les précautions nécessaires ne sont pas prises. De plus, seules certaines lignées cellulaires seront capables de s'agglomérer convenablement afin de fournir des sphéroïdes d'une densité suffisante.

La dernière technique, soit l'utilisation de systèmes microfluidiques (Figure 1.3 C), repose sur les principes d'adhérence pour former les sphéroïdes [8,12]. Les systèmes microfluidiques sont des dispositifs comportant des canaux de l'ordre du micromètre ou du millimètre au sein desquels il est possible de faire circuler différentes solutions aqueuses pour étudier des réactions ou faire croître des cellules [13,14]. Comme l'échelle à laquelle ils opèrent est du même ordre de grandeur que les cellules humaines, les réactions qui y sont effectuées peuvent se faire plus rapidement [15]. De plus, le volume de fluide requis pour les opérer étant faible, leur utilisation permet de diminuer le coût en matériel associé aux réactifs. Afin de profiter de ces avantages, plusieurs travaux ont été effectués pour y permettre la culture de sphéroïdes [8,12,16]. Le moyen le plus simple pour y parvenir est d'injecter une suspension cellulaire dans un dispositif présentant des trous et ayant été fonctionnalisé de manière à prévenir l'adhérence des cellules sur ses parois, favorisant l'agglomération des cellules et la formation de sphéroïdes. Ses principaux inconvénients sont le fait que la taille des sphéroïdes a tendance à y varier et que, comme pour les

gouttelettes suspendues, ils ne permettent de former des sphéroïdes qu'à partir de certaines lignées cellulaires. Toutefois, leur capacité à produire simultanément une très grande quantité de sphéroïdes, en plus de faciliter le changement de milieu et la croissance des sphéroïdes expliquent pourquoi cette approche a été utilisée pour ce projet.

La majorité des systèmes existants pour former de tels sphéroïdes ne permettent toutefois la réalisation que d'une seule condition expérimentale à la fois [8,12,16], ce qui peut être problématique dans un contexte de TC où le nombre d'essais à réaliser pour identifier une synergie peut être très grand. Pour remédier à ce problème, plusieurs approches sont possibles, mais la plus adaptée est l'utilisation de multiplexeurs microfluidiques, une gamme de dispositifs capables d'effectuer le routage de diverses solutions aqueuses, c'est-à-dire de les diriger dans le système, les acheminant dans des régions précises, selon les besoins de l'expérience, permettant ainsi d'effectuer rapidement différents mélanges. L'exemple le plus connu d'un tel dispositif est sans aucun doute celui de Thorsen et al. (2002) [14] qui utilise un ensemble de valves pneumatiques actives à pression positive ou valves de Quake afin de diriger des solutions dans 1 000 chambres indépendantes. Selon leurs travaux, avec une quantité $2n+1$ de valves, il serait possible de contrôler le transport de fluides à l'intérieur de 2^n chambres. De plus, comme les valves sont contrôlées par des pompes à pression pouvant être contrôlées par ordinateur, il est facile d'automatiser le dispositif. Ce type de valves et d'interface servirent par la suite à la réalisation de dispositifs permettant aussi la culture cellulaire [17], bien qu'elle se fit à petite échelle (4 chambres de culture) et en utilisant des techniques de culture en 2D. Le principal inconvénient de cette approche est le fait que l'utilisation des pompes à pression nécessite une source d'énergie externe et que son incubation, processus au cœur de la culture cellulaire, nécessite l'utilisation d'un incubateur personnalisé. Il existe donc un besoin pour un dispositif de culture cellulaire similaire, mais qui soit facile à utiliser, compatible aux incubateurs déjà présents en laboratoire et qui puisse cultiver les cellules en 3D.

1.2 Objectifs de recherche

L'objectif de ce projet est de développer un outil permettant l'étude des traitements combinatoires à haut débit utilisant des médicaments et de la RT sur des sphéroïdes. Pour ce faire, parce qu'elle est prometteuse et polyvalente, une approche microfluidique a été adoptée. Toutefois, pour pouvoir utiliser cette approche et atteindre cet objectif global, il est nécessaire de réaliser les sous-objectifs (OX) suivants dans l'ordre :

- O1.Développer des techniques de fabrication permettant le prototypage rapide de dispositifs;
- O2.Développer un système de valves microfluidiques simple à utiliser et pouvant séparer des chambres de culture de manière réversible;
- O3.Valider la résistance des valves à la pression suite à des traitements nécessaires à la culture cellulaire et aux essais combinatoires;
- O4.Concevoir un dispositif microfluidique adapté à la culture de sphéroïdes utilisant les techniques et technologies développées;
- O5.Valider les propriétés de routage du dispositif pour des solutions aqueuses;
- O6.Valider la formation de sphéroïdes dans le dispositif;
- O7.Évaluer la viabilité cellulaire et la croissance des sphéroïdes dans le dispositif.

Pour que ces objectifs soient considérés comme atteints, les critères (CX) suivants, qui constituent la base du cahier de charges de ce projet, doivent être remplis :

- C1. Il est possible de concevoir, fabriquer et tester un dispositif en moins d'une semaine (O1);
- C2. Les valves peuvent être fermées individuellement par un utilisateur inexpérimenté (O2);
- C3. Les valves peuvent être ouvertes et fermées plus d'une fois, sans altérer leur fonctionnement (O2);
- C4. Les valves peuvent résister à des pressions d'au moins 2 kPa après une incubation de 7 jours à 37°C et une exposition à une dose de RT de 8 Gy (O3);

Plus de détails sur la résistance minimale à la pression acceptable sont donnés dans la Section 3.3.3.4;

C5. Le dispositif permet la réalisation simultanée d'au moins 4 conditions de culture (O4);

Nombre minimal requis afin de faire la preuve du concept (dispositif de 2×2 chambres de culture);

C6. Les chambres de cultures sont séparées de plus de 6 mm (résolution des appareils de RT) dans chaque direction (O4);

C7. Les chambres de culture comportent au moins 25 puits (O4);

Quantité visée pour avoir un échantillonnage suffisant pour chaque condition de culture;

C8. La taille des puits est comprise entre 300 et 700 µm (O4);

Plage des tailles acceptables de manière à avoir un seul sphéroïde par puits, mais tout en conservant un échantillon qui peut être considéré comme 3D;

C9. Remplir le dispositif au complet, verticalement et horizontalement sans qu'il n'y ait de fuites (O5)

C10. Former des sphéroïdes dans la majorité des puits du dispositif en moins d'une semaine à partir d'une suspension de cellules reconnues pour former des sphéroïdes (O6);

C11. Obtenir des résultats de viabilité et de croissance cellulaire non significativement différents entre des sphéroïdes cultivés dans le dispositif et des sphéroïdes cultivés de manière conventionnelle sur une période de 7 jours (O7);

1.3 Organisation du mémoire

Le présent mémoire comporte six sections, incluant celle-ci. Tout d'abord, une introduction décrivant brièvement la situation actuelle dans le domaine de la recherche sur le cancer et la problématique. Cette section comporte aussi une courte analyse des éléments clés qui permettront de définir l'objectif de recherche, ainsi que leurs avantages et inconvénients. Par la suite, l'objectif principal et les objectifs secondaires qui y sont rattachés y sont décrits.

La seconde section porte sur les techniques de fabrication employées tout au long du projet. Les diverses méthodes de fabrication qui auraient pu être employées y sont décrites et comparées en fonction de leurs différents avantages et inconvénients afin de déterminer celle qui était la plus adaptée au présent projet. Ensuite, le processus de fabrication utilisé tout au long du projet ainsi que les défis rencontrés pour le mettre en œuvre seront décrits en détail.

La troisième section porte sur les valves développées afin d'effectuer le routage des liquides. Elle débute avec une courte description des types de valves qui auraient pu être utilisées et les raisons expliquant leur rejet ou leur sélection pour le projet sera effectuée. Après, le design des valves choisies ainsi que leur mode de fabrication seront décrits en détails. Finalement, la résistance des valves à la pression après différents traitements répandus en biologie sera évaluée.

La quatrième section porte sur le processus d'intégration des valves dans un dispositif permettant la culture de sphéroïdes. Il y sera aussi question des expériences de routage de fluides et de culture cellulaire qui ont été effectuées afin d'évaluer le potentiel de la technologie.

La cinquième section est un récapitulatif des principaux résultats obtenus lors du projet ainsi que des limites de l'approche utilisée. Elle contiendra aussi un retour sur l'atteinte des objectifs ainsi que le travail qu'il reste à accomplir pour la suite du projet.

Finalement, la sixième section conclura brièvement le mémoire et en résumera les principaux aspects.

1.4 Contribution de l'auteur

L'exécution de ce projet a nécessité le travail de plusieurs personnes, chacune apportant une contribution essentielle aux résultats qui seront présentés dans ce rapport. Ce projet aurait aussi été impossible sans l'utilisation des infrastructures déjà en place à l'École Polytechnique de Montréal, au sein du laboratoire du Pr Thomas Gervais, et au CRCHUM, au sein des laboratoires du Dr Philip Wong et du Dr Anne-Marie-Mes-Masson.

Le travail présenté étant l'objet d'un nouveau projet, l'auteur a dû mettre en place différents protocoles de fabrication et d'expérimentation afin de valider son travail. Tout d'abord, des méthodes de fabrication ont été développées dans le but de permettre le prototypage rapide de dispositifs pour la suite du projet. L'auteur étant la première personne du laboratoire à utiliser l'impression 3D, il a permis de déterminer les avantages et les limites réelles de la technique. Ce travail a été un processus itératif échelonné sur plus d'un an et adapté aux différents défis rencontrés lors des expérimentations, permettant d'établir des protocoles de fabrication pour les autres projets, faisant de l'impression 3D l'une des principales techniques de fabrication employées à ce jour par le laboratoire du Pr Gervais. Grâce à ces techniques, l'auteur a pu réaliser les différents dispositifs lui-même, à partir des designs réalisés.

La conception du dispositif a été réalisée par l'auteur en se basant sur les travaux de Bishnubrata Patra, stagiaire postdoctoral au moment du début du projet, pour l'approche utilisée pour la formation de sphéroïdes. La conception et l'intégration des valves dans le système ont été réalisées par l'auteur. La validation de leur résistance à la pression a été validée expérimentalement par l'auteur et grâce à un modèle numérique réalisé par Simon Guichandut, stagiaire ayant travaillé sur le projet à l'été 2016. Les expériences de routage ont été conçues et réalisées par l'auteur.

Les différentes expériences de culture cellulaire ont été réalisées en utilisant les protocoles et lignées cellulaires disponibles au CRCHUM. Les protocoles utilisés pour la préparation des dispositifs sont ceux établis par les laboratoires du Pr Gervais et celui du Dr Mes-Masson, avant le début de ce projet. Les premières cellules utilisées (STS 117) ont été fournies par le laboratoire du Dr Wong et cultivées par Julie Lafontaine, avant leur injection dans le système, puis par l'auteur suite à leur injection. Les secondes (OV90 et TOV1946) ont été fournies par le laboratoire du Dr Mes-Masson, dont l'équipe avait assuré la culture avant leur injection dans le

système. Leur injection et culture dans le système, ainsi que les images correspondantes, ont été réalisées par Frédérique Labelle, stagiaire à l'été 2017.

Ce projet et les différents résultats qui s'y rattachent ont donné lieu à une publication dans la revue *Sensors* à l'automne 2017 [18], ainsi qu'à une présentation d'affiche lors de la conférence µTAS 2017. Ces travaux ont aussi permis la présentation d'un séminaire donné à l'Université Laval dans le cadre du cours GEL-7073.

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

CHAPITRE 2 FABRICATION

Tout au long de ce projet, plusieurs itérations ont été nécessaires pour chacune des composantes du dispositif final, que ce soit au niveau des valves ou de la configuration du dispositif lui-même. Pour parvenir à rapidement mettre en œuvre chacun de ces éléments, le premier aspect nécessaire a été de déterminer une méthode de fabrication rapide, efficace et à cout moindre. Nous avons donc dû déterminer les matériaux nécessaires au fonctionnement du dispositif et les méthodes de fabrication et d'assemblage les plus adaptées à la réalisation d'un dispositif réalisé à partir de ce ou ces matériaux.

2.1 Matériaux

Dans ce projet, le choix des matériaux a été effectué en considérant les besoins du dispositif final. Le Tableau 2.1 présente une liste des différents types de matériaux utilisés dans le domaine de la microfluidique, ainsi que les différents avantages et inconvénients qui y sont rattachés [19,20]. Chacun de ces matériaux peut être associé à l'une des catégories suivantes : ceux nécessitant un moule pour être fabriqués et ceux à partir desquels il est aussi possible de concevoir directement le dispositif. La première catégorie est associée à des processus de fabrication moins couteux, mais à des étapes d'assemblage plus complexes et des restrictions au niveau des designs possibles, alors que la seconde est généralement plus coûteuse à fabriquer, mais offre plus de possibilités au niveau du design. Il est important de noter qu'avec l'avènement de l'impression 3D, la gamme des matériaux pouvant servir à la fabrication directe de dispositifs a grandement augmentée au cours des dernières années.

Comme le dispositif conçu devait être le plus simple possible à opérer et être préférablement compatible avec les incubateurs standards, il fut décidé d'utiliser le PDMS comme matériau pour la fabrication, principalement à cause de sa perméabilité à l'oxygène qui élimine le besoin de perfuser constamment la culture cellulaire afin d'assurer un apport suffisant en oxygène aux cellules [21]. Le principal inconvénient de son utilisation est la grande variabilité de ses propriétés de surface dans le temps qui pourrait affecter la résistance des valves à long terme, ce qui explique la multitude de tests qui furent réalisés pour assurer le bon fonctionnement de valves et qui seront présentés plus loin dans ce chapitre.

Tableau 2.1 : Description des matériaux utilisés en microfluidique

Matériau	Description	Avantages	Inconvénients
Silicium [19,20]	Une ou plusieurs plaques de silicium peuvent être découpées, puis fusionnées pour réaliser un dispositif	<ul style="list-style-type: none"> • Très haute résolution • Grand contrôle des propriétés de matériau et de surface 	<ul style="list-style-type: none"> • Très dispendieux • Non perméable à l'oxygène • Difficulté à incorporer des composantes mobiles (valves) • Opaque dans le spectre de la lumière visible
Polymethyl-metacrylate (PMMA) [19,20]	Une ou plusieurs plaques de PMMA peuvent être découpées, puis fusionnées pour réaliser un dispositif. Il est aussi possible de mouler des structures dans le PMMA par embossage à chaud	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité au niveau des propriétés de surface et de matériaux • Faible cout • Transparent dans le spectre de la lumière visible 	<ul style="list-style-type: none"> • Non perméable à l'oxygène • Difficulté à incorporer des composantes mobiles (valves)
PDMS [19,20]	Le PDMS est versé dans un moule où il durcit, puis il est démoulé et lié à d'autres structures pour réaliser un dispositif	<ul style="list-style-type: none"> • Perméable à l'oxygène • Transparent dans le spectre de la lumière visible • Flexible 	<ul style="list-style-type: none"> • Propriétés du matériau et de surface très variables
Thermoplastiques [19,20]	Le thermoplastique est moulé par injection, puis lié à d'autres structures pour réaliser un dispositif	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité au niveau des propriétés de surface et de matériaux • Très faible cout • Transparent dans le spectre de la lumière visible 	<ul style="list-style-type: none"> • Non perméable à l'oxygène • Difficulté à incorporer des composantes mobiles (valves)
Résine [22–24]	La résine est durcie grâce à une imprimante 3D dans le but de réaliser un dispositif complet	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun assemblage requis • Fabrication rapide • Grande flexibilité au niveau du design 	<ul style="list-style-type: none"> • Faible résolution • Non perméable à l'oxygène • Non biocompatible

Comme mentionné dans le Tableau 2.1, l'utilisation du PDMS requiert la fabrication de moules. Les techniques les plus répandues pour ce faire sont la micro-fabrication, le

micro-usinage et l'impression 3D. Les avantages et inconvénients de ces techniques sont présentés dans le Tableau 2.2 [20,25]. Compte tenu de son faible cout et de sa capacité à produire rapidement des prototypes, c'est l'impression 3D qui a été choisie comme modalité pour la réalisation des moules au cours de ce projet. Ainsi, il était possible, en moins d'une journée, de concevoir un moule, de le fabriquer, d'effectuer un premier moulage, d'assembler le dispositif et de le tester, ce qui aurait été impossible avec les autres modalités. De plus, un élément critique du choix de cette modalité par rapport au micro-usinage fut sa facilité de mise en œuvre. En effet, comme l'utilisation de l'impression 3D ne nécessite pas l'emploi de matières dangereuses et est indépendante de l'expérience de l'opérateur, contrairement à la microfabrication et au micro-usinage, sa mise en œuvre s'en trouve grandement simplifiée. Même si la résolution de l'impression 3D est inférieure à celle des autres techniques, elle était suffisante pour réaliser les modèles désirés, puisque les éléments les plus petits de ceux-ci étaient de quelques centaines de microns. L'impression 3D produit aussi des moules dont la durée de vie est largement inférieure à celle des autres techniques. En effet, comme il sera discuté plus en détail dans la section 2.2.4, il est nécessaire d'effectuer un recouvrement de la surface du moule avant de pouvoir y mouler du PDMS. Ce recouvrement s'effritant au fil des usages, le moule ne peut être utilisé que quelques dizaines de fois, contrairement aux moules réalisés par microfabrication et micro-usinage qui peuvent être utilisés des centaines de fois, si ils sont manipulés avec soin.

Tableau 2.2 : Description des techniques de fabrication de moules en microfluidique [20,25]

	Microfabrication	Micro-usinage	Impression 3D
Environnement	Salle blanche	Non déterminant	Non déterminant
Précision	<1 µm	~10 - 100 µm	~ 10 - 1000 µm
Temps de fabrication	Jours	Heures	Dizaines de minutes
Taille des éléments	10 à 200 µm	100 µm et plus	200 µm et plus
Complexité	++++	++	-
Robustesse	++	+++	-

Toutefois, comme les moules n'étaient destinés qu'à servir à la production de quelques prototypes, l'impression 3D a été choisie comme mode de fabrication dans le cadre de ce projet. Le micro-usinage pourrait toutefois servir, une fois le projet complété, à la réalisation de moules plus robustes, permettant une production à plus grande échelle. L'utilisation de l'impression 3D pour effectuer des moules en PDMS est cependant une technique qui commence seulement à être adoptée et qui présente plusieurs défis qui seront abordés dans la prochaine section.

2.2 Impression 3D

Bien que l'impression 3D soit souvent considérée comme une technologie omnipotente, c'est encore une jeune technologie et plusieurs éléments limitent ses possibilités [25]. Tout d'abord, une brève revue de l'historique et des imprimantes disponibles sur le marché sera effectuée. Le fonctionnement de ces imprimantes pouvant varier grandement de l'une à l'autre, les processus de conception, d'impression et de préparation au moulage doivent être adaptés au type d'imprimante et de matériau employés. Les techniques utilisées pour ce faire seront abordées dans cette section.

2.2.1 Historique

L'impression 3D est une technique de fabrication par ajout de matière qui réfère à la formation de liaisons entre les éléments d'une matrice libre, que ce soit par polymérisation, frittage ou ajout de colle. Son origine date du milieu des années 80 avec l'invention des fichiers STL ou stéréolithographie par Chuck Hull qui permettent la segmentation d'un modèle 3D réalisé par ordinateur en un ensemble de couches d'épaisseur définie [26]. Par la suite, en transmettant le plan des couches à l'imprimante, il est possible de réaliser le modèle en liant successivement les éléments de la matrice, un étage à la fois. Les principales méthodes d'impression sont présentées à la Figure 2.1 [27].

L'impression 3D est un champ de recherche qui est en plein essor depuis les 5 dernières années, le nombre de publications y étant associé ayant passé de moins d'une centaine il y a cinq ans à presque trois mille aujourd'hui (Figure 2.2). De manière analogue, son utilisation dans le domaine de la microfluidique est passée de moins d'une dizaine d'articles par année à plus de 140 au cours de la même période. Cet engouement a donné naissance à une multitude d'imprimantes possédant différents modes de fonctionnement, chacune étant plus adaptée à

certaines applications. Il est donc crucial de choisir l'imprimante 3D qui convient le mieux à nos besoins.

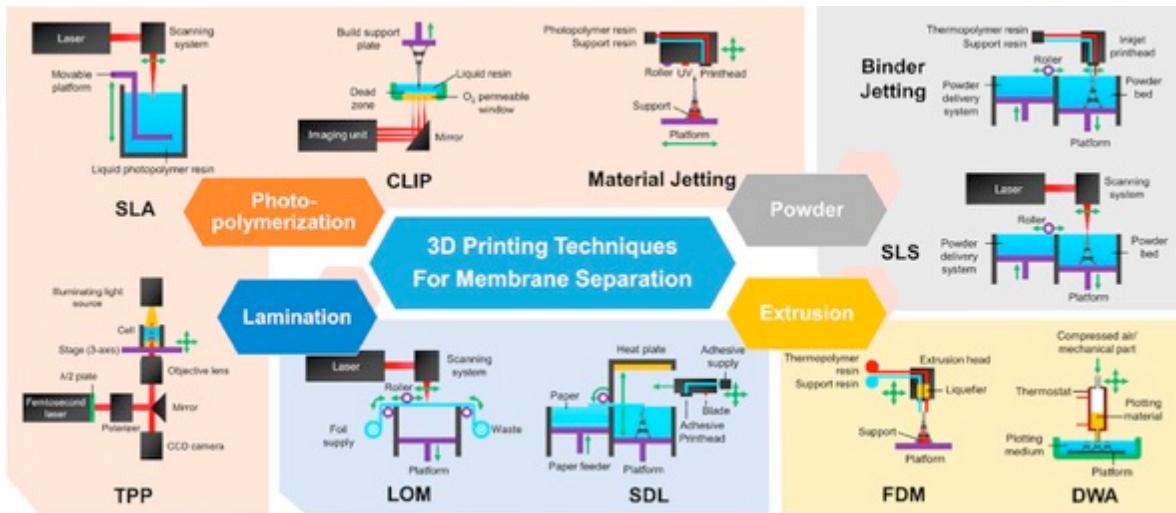


Figure 2.1 : Principaux modes d'impression 3D

*Figure de [27] sous licence CCBY

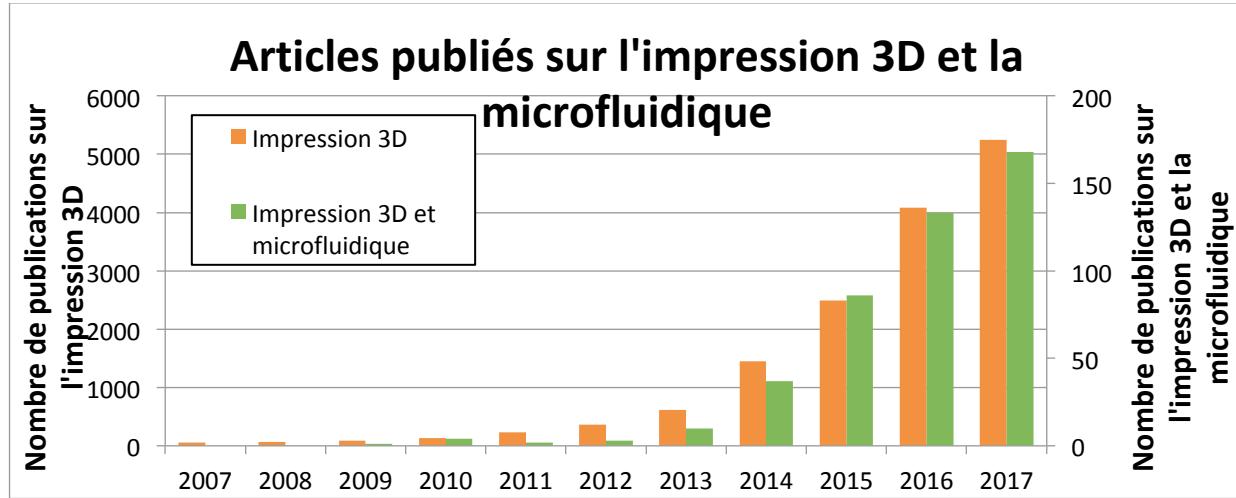


Figure 2.2 : Articles publiés sur l'impression 3D et la microfluidique

Recherche effectuée sur le site Web of Science avec les mots clés «3d print* OR "addit* manuf*» et «("3d print*" OR "addit* manuf*") AND ("microflui*" OR "uflui*" OR "μflui*")» le 1 avril 2018.

Dans notre cas, comme nous désirons réaliser des moules pour le moulage du PDMS, quatre facteurs ont été pris en compte : la résolution, la taille maximale de l'impression, le temps d'impression, la flexibilité des designs possibles et le prix de l'appareil. Le Tableau 2.3 permet de comparer ces éléments pour quatre types d'imprimantes utilisées dans le domaine de la

microfluidique, soit les imprimantes à stéréolithographie inversée, à polymérisation deux photons, à jet et à extrusion [22,23,25,27].

Puisque nous désirions réaliser des structures de quelques centaines de microns, les techniques à deux photons, même si elles fournissent la plus haute résolution, n'étaient pas adaptées à nos besoins. Cela s'explique par leur temps de fabrication élevé et de leur difficulté à réaliser des structures de plus de 100 µm. En ce qui concerne les techniques se basant sur l'extrusion, leur faible résolution se traduit généralement par une rugosité élevée. Cette rugosité rend impossible la liaison entre les étages de PDMS moulés, en plus d'être problématique lors de l'opération du dispositif. Finalement, bien que la flexibilité accrue au niveau du design des imprimantes à jet soit un avantage pour d'autres applications, elle n'est pas d'une importance clé lors de la formation de moules, ne justifiant pas la différence de prix entre cette technologie et la stéréolithographie inversée. Ainsi, ce sont les imprimantes à stéréolithographie inversée qui conviennent le mieux aux besoins du présent projet. Parmi celles fonctionnant selon ce principe, celles de la compagnie Asiga (Asiga, Alexandria, Australia) furent sélectionnées à cause de leur résolution, de la taille des impressions qu'elles permettent de réaliser, de leur prix et de la flexibilité au niveau des résines pouvant être utilisées.

Tableau 2.3 : Caractéristiques des différents types d'imprimantes 3D [22,23,25,27]

	Stéréolithographie inversée	Polymérisation à deux photons	Jet	Extrusion
Taille minimale des éléments	~50 - 100 µm	~ 1 µm	~ 300 µm	~ 400 µm
Taille de l'impression	Proportionnel à la résolution	Jusqu'à 10×10 cm	Centaines de cm ²	Centaines de cm ²
Temps d'impression	Quelques cm/h	Quelques mm/h	Quelques cm/h	Quelques cm/h
Flexibilité du design	+	+	++	-
Prix	\$\$\$	\$\$\$\$\$	\$\$\$\$	\$

Ce dernier aspect, bien qu'il n'ait pas été exploré en profondeur au cours de ce projet, devrait permettre d'utiliser l'imprimante pour d'autres projets du laboratoire où les propriétés de la résine utilisée sont plus importantes. Les processus employés lors de ce travail de recherche ont donc été développés pour l'utilisation d'une imprimante Asiga Freeform Pico, d'une Asiga Pro 2 et la résine PlasCLEAR v2.0 de la même compagnie et seront présentés dans cette section.

2.2.2 Conception

Le premier élément affecté par les propriétés de l'imprimante et de la résine utilisée est la conception du moule lui-même. Les principaux facteurs à prendre en considération lors de la conception d'un moule sont : la résolution de l'imprimante, son mode de fonctionnement et la rigidité de la résine durcie.

Dans le cas de l'imprimante Asiga Freeform Pico, bien que la résolution théorique soit de l'ordre de 27 µm, une expérience simple où des cubes de différentes grosseurs ont été réalisés (Figure 2.3) nous a révélé que les plus petites structures réalisables par l'imprimante étaient des cubes de 200 µm séparés par 200 µm, soit d'environ 8 pixels. En deçà de cette taille, les formes obtenues ne correspondaient pas à celles entrées dans le fichier source. Ces valeurs sont supérieures à celles recommandées par Gong et al. (2015) [28], qui recommandent une largeur de quatre pixels, mais peuvent s'expliquer par la différence entre les résines utilisées et le fait qu'ils utilisent cette mesure afin de réaliser des canaux (régions sans matière), alors que nous effectuons des extrusions. Une autre différence est le fait que, lors du design de la plaque de tests, nous n'avons pas considéré le fait que les pixels étaient orientés à 45°, ce qui aurait pu engendrer une légère erreur.

Le deuxième élément à considérer lors du design d'un moule est le mode d'impression utilisé par l'imprimante qui, dans le cas de l'imprimante d'Asiga, est la stéréolithographie inversée. Ce mode de fonctionnement repose sur la polymérisation de couches successives de résine photosensible par l'exposition à une source de lumière UV (Figure 2.4 A à D). Initialement, la résine non-durcie se trouve dans un bain, puis une plaque montée sur un axe vertical descend jusqu'au fond de ce bain. L'impression elle-même est constituée de successions d'expositions de la résine à une source de lumière UV et de déplacements vers le haut de la plaque sur laquelle l'impression a lieu. Ces déplacements varient selon la hauteur de couche choisie par l'utilisateur et sont suivis d'un balayage du fond du bain par une pièce métallique appelée *slider*. Cette pièce

métallique permet de s'assurer qu'une couche uniforme de résine est présente sur la surface de la pièce imprimée avant la prochaine exposition, en plus de décoller la résine durcie du fond du bain. La hauteur de couche, qui peut varier de 1 à 150 µm, affecte le temps d'exposition ainsi que le temps d'impression et peut affecter la résolution de l'imprimante. En effet, il semble y avoir une certaine erreur sur le déplacement vertical de la plateforme, ce qui fait en sorte que la hauteur de couche devrait être du même ordre de grandeur que la taille des éléments les plus importants pour l'impression. De plus, le frottement du *slider* sur la membrane présente au fond du bain de résine a tendance à abimer cette dernière avec le temps, ce qui crée des défauts sur la surface des impressions, prévenant l'impression convenable des éléments de moins de 50 µm, comme on peut le voir à la Figure 2.3 A. Pour cette raison, la hauteur de couches choisie pour toutes les impressions subséquentes fut de 50 µm, de manière à assurer une résolution assez haute, sans toutefois affecter trop grandement le temps d'impression ou de créer des erreurs trop élevées sur la hauteur des éléments.

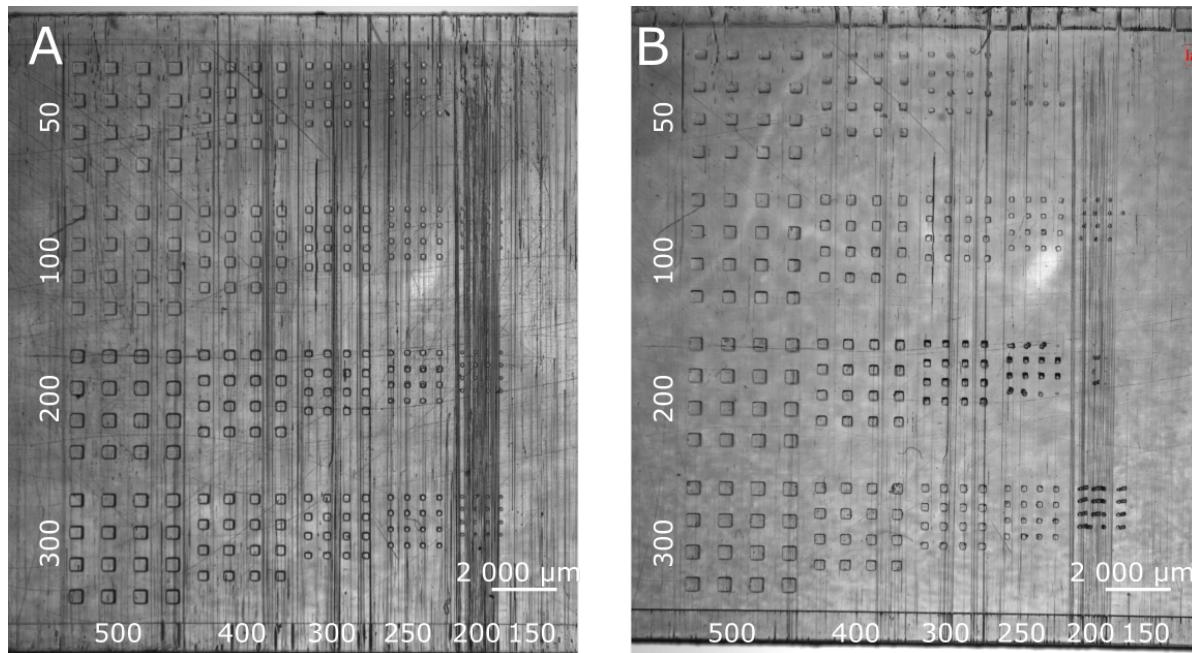


Figure 2.3 : Cible de résolution pour l'Asiga Freeform Pico

Impression de carrés d'arrêt de 150 à 500 µm séparés par la même longueur (bas de la figure) et de hauteur de 50 à 300 µm (gauche de la figure) avec une épaisseur de couche de (A) 50 µm et de (B) 100 µm.

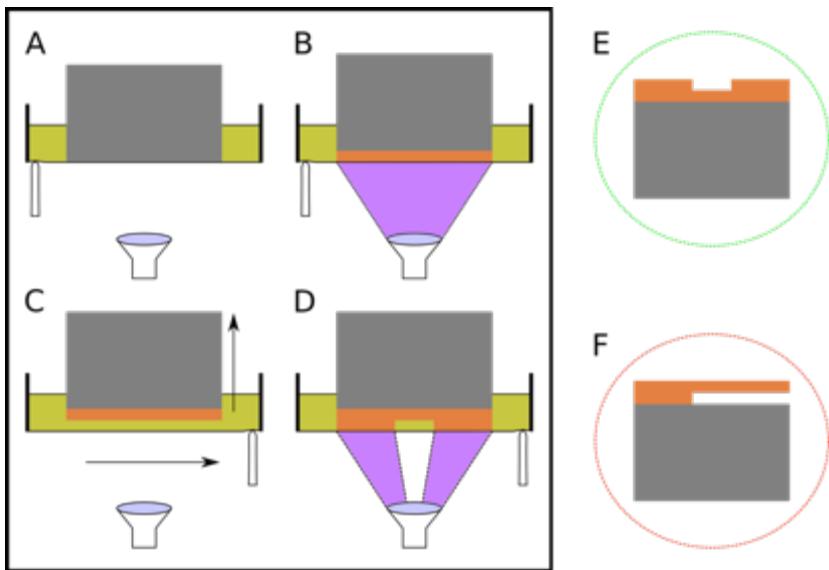


Figure 2.4 : Différentes étapes de la stéréolithographie inversée et règles de design

(A) La plateforme métallique descend au fond d'un bain de résine, puis (B) monte d'une épaisseur de couche, avant l'exposition de la couche à la lumière UV par un réseau de micro-miroirs. (C) La plateforme monte d'une nouvelle épaisseur de couche et le slider se déplace horizontalement. (D) La résine est de nouveau exposée selon le patron dicté par le réseau de micro-miroirs. (E) et (F) Exemples de structures construites selon un modèle (E) pyramidal et (F) en porte-à-faux.

La stéréolithographie inversée affecte aussi la conception, puisque comme il n'y a pas de matériau pour supporter la résine une fois la polymérisation effectuée, il est impératif de construire les moules selon un modèle pyramidal (Figure 2.4 E) et d'éviter les structures en pyramide inversée ou en porte-à-faux (Figure 2.4 F). En effet, bien qu'il soit possible de réaliser des structures en porte-à-faux, leur réalisation requerrait l'utilisation de supports, qui peuvent affecter la finition du moule, et une connaissance approfondie de la rigidité de la résine une fois polymérisée, afin d'en diminuer le nombre autant que possible.

Le troisième élément à considérer lors du design est donc la rigidité de la résine qui peut aussi affecter le processus de moulage lui-même. En effet, lors du séjour dans le four, une pratique répandue pour le moulage rapide du PDMS à cause de sa capacité à diminuer le temps requis pour son durcissement [29], il fut remarqué que la résine PlasCLEAR v2.0 avait tendance à se ramollir et à se replier sur elle-même. Ce phénomène, qui est plus important chez les moules de grande taille, avait pour conséquence de faire varier l'épaisseur de la couche de PDMS, ce qui peut causer une variation importante dans la résistance des valves sur un même dispositif (voir section 3.3.3.4 pour plus de détails). Chez les moules de petite taille, ce phénomène peut être limité en laissant un bloc plein de 5 mm de hauteur comme base au moule. Toutefois, sur des

moules de plus grande taille, la solution la plus simple fut de les fixer à un matériau de support rigide ne se déformant pas ou très peu sous l'effet de la chaleur. Ainsi, les températures utilisées étant généralement inférieures ou égales à 80°C, une plaque de polyméthacrylate de méthyl (PMMA), dont le point de fusion est de 170°C [30] et qui peut facilement et précisément être usinée à l'aide d'un appareil de découpe laser fut choisie comme matériau de support. En laissant des trous dans le design, il fut possible de visser le moule à la plaque de PMMA pour éviter des déformations trop importantes (Figure 2.5).

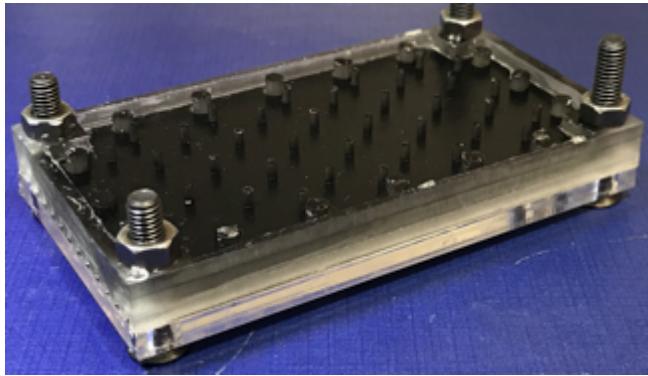


Figure 2.5 : Moule fixé à une plaque de PMMA

La conception elle-même fut effectuée grâce au logiciel Catia (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, France) qui permet la réalisation de modèles 3D, en plus de leur exportation en fichiers de stéréolithographie (.stl) qui sont reconnus par la majorité des imprimantes 3D. Tout au long du projet, les moules conçus furent réalisés avec une paroi d'au moins 1 mm afin de permettre le moulage et le démoulage du PDMS. De plus, la limite estimée de la taille des éléments réalisés par l'Asiga Freeform Pico (pixels de 27 µm) étant de 200 µm, il a été décidé de réaliser des éléments dont la taille minimale serait de 300 µm puisque le dispositif final était fabriqué avec l'Asiga Pro 2 (pixels de 50 µm). Plus d'informations sur les moules ayant servis à la fabrication de chacun des dispositifs seront fournies dans les chapitres correspondants.

2.2.3 Impression

Cette section décrit le protocole utilisé lors de chaque impression réalisée dans le cadre de ce projet. Tout d'abord, une fois le dessin réalisé, il est exporté directement en format .stl en utilisant la fonction *enregistrer sous* de Catia, de manière à pouvoir être reconnu par le logiciel Asiga Composer. Ce logiciel sert principalement à définir les paramètres d'impression comme le temps d'exposition de la résine, la hauteur des couches de l'impression, le délai entre chaque

exposition et autres. Il permet aussi de réaliser certaines transformations mineures sur le modèle telles des rotations, translations et changements d'échelles, en plus de permettre l'addition de supports. Le processus de préparation commence par la sélection du type de résine utilisée (PlasCLEAR v2.0), ainsi que la hauteur de couche désirée. L'élément limitant dans le temps d'impression étant le déplacement du *slider*, le temps d'impression est directement proportionnel au nombre de couches réalisées. Compte tenu de la forme des moules, soit un bloc plein dont certaines parties rétrécissent pour former les éléments d'intérêt, l'utilisation de supports n'était pas nécessaire. Une fois le type de résine choisie et la hauteur de couches réglée, le modèle est importé dans le logiciel, puis son positionnement est vérifié afin de s'assurer qu'il soit collé sur la plaque et dans le champ d'impression. Le modèle est ensuite transmis à l'imprimante avec les paramètres d'impression par défaut de la résine.

Avant chaque impression, le fond du bain de résine est exposé à la lumière UV pour une durée de 20 s, formant une pellicule au fond du bain, de manière à y piéger les particules qui s'y trouvent et qui pourraient gêner l'impression. La pellicule est ensuite retirée à l'aide de pinces en plastique et l'impression peut avoir lieu. Suite à l'impression, les pièces sont détachées manuellement de la plateforme et subissent les traitements recommandés par le fabricant. Ces traitements sont constitués de deux bains successifs d'isopropanol de 5 min afin de retirer les résidus de résine non-polymérisée présents à leur surface, d'un séchage à l'azote après chaque bain et d'un séjour sous une lampe UV pour une durée de 5 min afin de durcir la résine après le second bain. L'ensemble du processus (impression et traitements) prennent environ 45 min pour un moule réalisé avec l'Asiga Pico et 2 h avec l'Asiga Pro 2.

2.2.4 Préparation au moulage

Après toutes ces étapes, il serait théoriquement possible d'utiliser directement les moules. Par contre, au cours du projet, il a été observé que lors du premier moulage le PDMS éprouve de la difficulté à polymériser lorsque déposé directement dans les moules, en plus d'être difficilement démoulable lors des autres moulages. Selon Comina et al. (2014) [31], ce phénomène proviendrait d'une interaction entre la résine et le PDMS et pourrait être prévenu en effectuant un recouvrement de la surface du moule, évitant ainsi le contact entre la résine et le PDMS. Un processus de recouvrement des moules à l'aide d'encre ou de vernis ainsi qu'une silanisation des moules furent donc testés dans le but de trouver le traitement qui produirait les

meilleurs résultats. La silanisation est un procédé qui fut introduit lors du développement des techniques de fabrication sur silicium et permet d'en modifier les propriétés de surface afin de faciliter le moulage du PDMS [30]. Le Tableau 2.4 consigne les résultats obtenus pour l'ensemble des produits essayés. Dans tous les cas, suite au durcissement sous une lampe UV décrit précédemment, les dispositifs furent déposés dans un bain ultrasonique d'éthanol chauffé pendant 5 min et séchés à l'azote avant l'application de l'encre ou du vernis. Ce processus permet de retirer les derniers résidus de résine non-durcie présents dans les pores du moule, en plus de lisser légèrement la surface, facilitant ainsi l'adhésion de l'encre ou du vernis. Par la suite, l'encre ou le vernis séchèrent pendant au moins 24 h avant que le premier moulage ne soit effectué. Pour ce qui est de la silanisation, le traitement consiste à ajouter quelques gouttes d'agent silanisant (Trichloro-octadecyl-silane, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) sous une cloche à vide avec les échantillons à traiter et les laisser reposer pendant 2h.

Suite à ces analyses, deux types d'encre se démarquent des autres, soit le *Sharpie* permanent noir (*Sharpie*, Atlanta, GA) et l'encre Aztek noire à l'eau (Testors, Vernon Hills, IL). Contrairement aux vernis, ces encres n'affectent pas la transparence du PDMS. De plus, contrairement à l'encre noire à l'huile de Testors et à la silanisation, elles permettent au PDMS de durcir suffisamment pour être facilement retiré lors de tous les moulages (initial et subséquents). Elles sont aussi plus faciles à appliquer que les vernis et la peinture à l'huile, car elles sont visibles à l'œil nu et nécessitent moins de précautions pour être utilisées. Toutefois, à cause du caractère manuel de la technique, l'application du *Sharpie* permanent noir nécessite une force physique supérieure à celle nécessaire pour appliquer l'encre Aztek noire, en plus de produire un recouvrement moins uniforme, comme l'illustre la Figure 2.6.

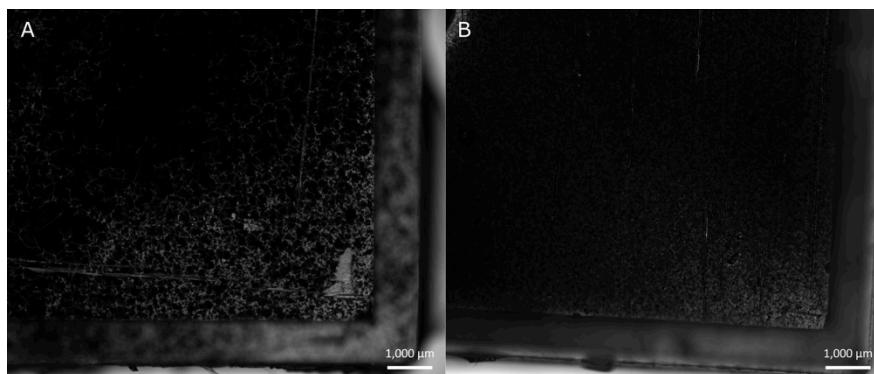


Figure 2.6 : Différents recouvrements de moules

(A) Recouvrement manuel avec l'encre de crayon permanent noir de marque *Sharpie* et (B) à l'aérographe avec l'encre Aztek noire à base d'eau.

Tableau 2.4 : Moulages de PDMS après recouvrement de la surface du moule

Traitement*	Observations premier moulage	Observations deuxième moulage
Aucun	<ul style="list-style-type: none"> PDMS ne durcit pas au fond du moule 	<ul style="list-style-type: none"> PDMS durcit Déchirures lors du démoulage
Crayon permanent <i>Sharpie</i> noir (aérographe manuel)	<ul style="list-style-type: none"> PDMS durcit et s'enlève facilement Résidus d'encre présents sur le PDMS une fois durcit Application laborieuse et non-uniforme à cause du caractère manuel 	<ul style="list-style-type: none"> Comme le premier moulage
Aztek noir à l'eau (aérographe)	<ul style="list-style-type: none"> PDMS durcit PDMS s'enlève, mais légères déchirures Du PDMS reste collé sur le moule 	<ul style="list-style-type: none"> PDMS durcit PDMS plus facile à retirer Excellent concordance des structures
Aztek vernis clair à l'eau (aérographe)	<ul style="list-style-type: none"> Présence de bulles d'air dans le PDMS PDMS facile à retirer et excellente concordance des structures PDMS translucide 	<ul style="list-style-type: none"> Aucune bulle d'air PDMS plus facile à retirer que lors du premier moulage Excellent concordance des structures PDMS translucide
Create FX vernis émail à l'huile (aérographe)	<ul style="list-style-type: none"> PDMS facile à retirer et excellente concordance des structures PDMS translucide 	<ul style="list-style-type: none"> Comme premier moulage
Testors noir à l'huile dilué à un ratio 2 :1 (aérographe)	<ul style="list-style-type: none"> Présence de bulles d'air PDMS facile à retirer et excellente concordance des structures 	<ul style="list-style-type: none"> PDMS durcit difficilement et déchire pendant le démoulage
Silanisation 2h	<ul style="list-style-type: none"> PDMS durcit Déchirures lors du démoulage 	<ul style="list-style-type: none"> Comme premier moulage

*Chaque traitement a été testé au moins deux fois (premier et deuxième moulage) sur deux moules différents

Ainsi, le recouvrement qui convient le mieux est l'encre Aztek noire à l'eau, puisqu'elle permet le détachement et le durcissement du PDMS dès le premier moulage, est facile à appliquer à cause du contraste de couleurs et s'applique aisément de manière uniforme grâce à l'aérographe.

2.3 Moulage

Une fois le moule préparé, il faut préparer et mouler le PDMS. La préparation du PDMS s'effectue en mélangeant une quantité précise de monomère et d'agent durcissant, le ratio utilisé affectant directement la vitesse de durcissement et la rigidité du PDMS. Un ratio monomère : agent durcissant de 10 :1 est recommandé par le fabricant (Dow Corning, Midland, MI), dans le but d'obtenir un échantillon suffisamment flexible et dont le temps de durcissement ne soit pas trop long. Toutefois, il est possible de modifier ce ratio et la température de durcissement, afin de modifier le module de Young du PDMS (Tableau 2.5) [29,32–34]. Ainsi, nous avons augmenté ce ratio à 20 :1 pour la formation des membranes afin d'obtenir du PDMS plus flexible, ce qui permet d'augmenter la résistance des valves. Les autres parties des systèmes furent composées à partir de PDMS 10:1.

Tableau 2.5 : Module de Young du PDMS

Ratio monomère : Agent durcissant	Température de durcissement	Temps de durcissement	Module de Young
5 :1	90°C	15 min	868 kPa
7,5 :1	90°C	15 min	826 kPa
10 :1	90°C	15 min	750 kPa
12,5 :1	90°C	15 min	549 kPa
15 :1	90°C	15 min	360 kPa
10 :1	25	48 h	1,32 MPa
10 :1	100	48 min	2,05 MPa
10 :1	125	33 min	2,46 MPa
10 :1	150	23 min	2,59 MPa
10 :1	200	18 min	2,97 MPa
20 :1	25°C	72 h	1 MPa*

*Mesure estimée par l'auteur à partir de l'ensemble des données recueillies

Suite à sa préparation, le mélange fut mis sous vide pour en retirer les bulles d'air et éviter la formation de défauts lors de son durcissement. Une fois les bulles d'air disparues, le mélange est déposé dans un moule, dont il forme un négatif en durcissant. Comme mentionné à la Section 2.2.2, la résine composant les moules avait tendance à se ramollir à haute température, ce qui causait un repliement du moule sur lui-même lors du durcissement du PDMS dans le four (1h à 80°C). Pour éviter ce phénomène, les moules étaient vissés à des plaques de PMMA avant leur séjour dans le four afin de préserver leur forme.

Dans le cas de la préparation de membranes, le PDMS fut versé sur une gaufre de verre ayant été silanisée pendant 2h, qui était déposée sur une tournette, afin d'obtenir une membrane mince et d'épaisseur uniforme. La silanisation permet de diminuer l'angle de contact entre le PDMS (hydrophobe) et le verre (hydrophile), facilitant l'obtention de membranes minces [30]. La vitesse de rotation de la tournette choisie fut de 300 rpm pendant une minute, ce qui permet l'obtention d'une membrane de 115 µm. Par la suite, le PDMS durcit pendant 72h à température pièce afin de conserver une flexibilité élevée, tout en permettant son détachement du substrat de verre sans qu'il ne se déchire.

2.4 Assemblage

Une fois chacune des parties du dispositif fabriquée, il est nécessaire de les assembler pour obtenir un dispositif fonctionnel. Le PDMS présent dans les moules est d'abord retiré à l'aide d'un bistouri. Par la suite, avec un poinçon à biopsie, les entrées, les sorties et les ouvertures correspondant aux valves peuvent être percées. Les étages sont ensuite liés en exposant les faces à lier à un plasma atmosphérique Enercon Dyne-A-Mite (Enercon Industries Corporation, Menomonee Falls, WI) pour une durée de 60 s pour les dispositifs de plus grande taille ou de 30 s pour ceux de plus petite taille. Ce processus a pour effet d'exposer les liaisons des atomes d'oxygène à la surface du PDMS [35]. Ainsi, en collant rapidement ensemble les surfaces exposées, il est possible de créer des liaisons covalentes entre les deux étages de PDMS, ce qui les lie de manière permanente. Toutefois, il est bien important de ne pas surexposer les surfaces, parce que cela peut entraîner une vitrification du PDMS, prévenant la liaison entre les surfaces [35].

L'assemblage du dispositif lui-même varie en fonction du type de valve utilisé, mais suit le format suivant :

- un des étages moulés est lié à la membrane qui se situe toujours sur son substrat;
- le pourtour de l'assemblage est découpé avec un bistouri et détaché du substrat de verre;
- les entrées et sorties sont percées dans la membrane avec un poinçon à biopsie;
- l'assemblage est lié à un autre des étages moulés;
- ces étapes sont répétées pour chacun des étages nécessitant une membrane.

La Figure 2.7 décrit le processus de fabrication et d'assemblage utilisé pour la création d'un dispositif utilisant une valve magnétique manuelle.

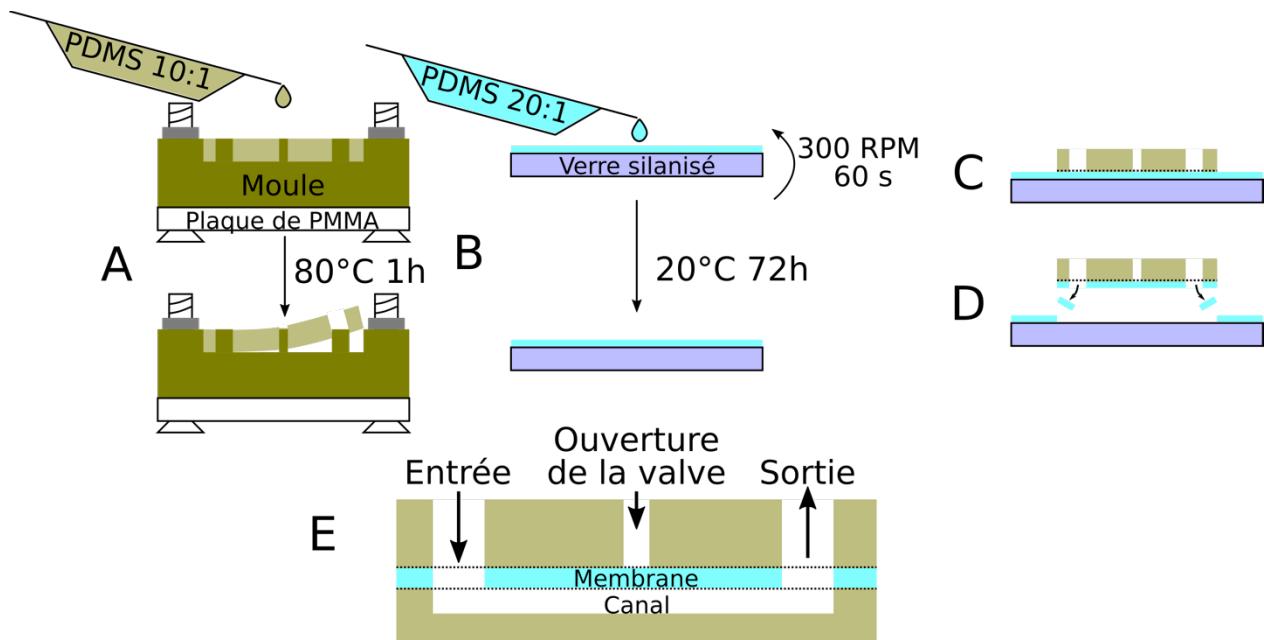


Figure 2.7 : Processus de fabrication et d'assemblage d'une valve magnétique manuelle

(A) Moulage du corps du dispositif. (B) Fabrication de la membrane à partir de PDMS 20:1 pour une épaisseur de 115 µm (Module de Young \approx 1 MPa). (C) Assemblage d'un étage de PDMS sur la membrane (toujours sur substrat de verre) après exposition à un plasma atmosphérique pendant 30 s. (D) Retrait de la membrane du substrat de verre, puis perçage des entrées et des sorties. (E) Assemblage du dernier étage de PDMS sur l'autre côté de la membrane après exposition à un plasma atmosphérique pendant 30 s.

CHAPITRE 3 VALVES

Comme mentionné dans le Chapitre 2, la manière la plus simple de séparer des chambres de culture de manière étanche et réversible dans un système microfluidique est l'utilisation d'un réseau de valves microfluidiques. Tout d'abord, une courte revue des types de valves les plus répandues en microfluidique sera réalisée. Par la suite seront abordées les deux types de valves manuelles qui furent explorées dans le cadre de ce projet : les valves pneumatiques, dont le fonctionnement est axé sur une variation de pression; et les valves magnétiques, dont le fonctionnement est axé sur la force appliquée par un aimant sur un corps ferromagnétique. Ce chapitre portera sur les modes de fonctionnement détaillés, modèles et modes de fabrication employés et les résultats obtenus pour chacun de ces types de valves.

3.1 Types de valves

Il existe plusieurs variétés de valves microfluidiques, mais elles fonctionnent généralement toutes sur le même principe : une membrane, disposée au dessus d'un canal, est déformée à l'aide d'une force extérieure afin d'ouvrir ou de fermer le canal, permettant ou empêchant la circulation du fluide. Ces valves peuvent généralement être associées à l'une des deux catégories suivantes : les valves actives, qui requièrent une source d'électricité et une interface numérique afin d'être opérées, et les valves manuelles, qui n'en nécessitent pas. Le Tableau 3.1 décrit les principaux avantages de ces différents types de valves.

Tableau 3.1 : Comparaison des valves actives et manuelles

Type de valve	Avantages	Inconvénients
Actives	<ul style="list-style-type: none"> • Peuvent être contrôlées à distance avec un ordinateur • Facile de contrôler plusieurs valves simultanément • Automatisation possible 	<ul style="list-style-type: none"> • Nécessitent beaucoup d'équipement pour être opérées • Nécessite un opérateur expérimenté • Nécessite un incubateur adapté au dispositif • Prix élevé
Manuelles	<ul style="list-style-type: none"> • Compacts • Simples à opérer • Souvent compatibles à l'incubation standard • Économiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Doivent être opérées manuellement

Comme l'un des objectifs visés par ce projet est qu'il soit utilisé par des chercheurs en biologie, son utilisation devrait être le plus simple possible et ne pas nécessiter de formation, afin de faciliter son adoption par les utilisateurs. Ainsi, les valves manuelles, même si leur utilisation peut être plus lente, sont celles qui conviennent le mieux à cet objectif.

Parmi les valves manuelles, il existe plusieurs moyens de contrôler les valves, les principaux étant une variation chimique dans l'environnement, l'application d'une contrainte mécanique, l'application d'une variation de pression ou l'utilisation de la force magnétique (Figure 3.1).

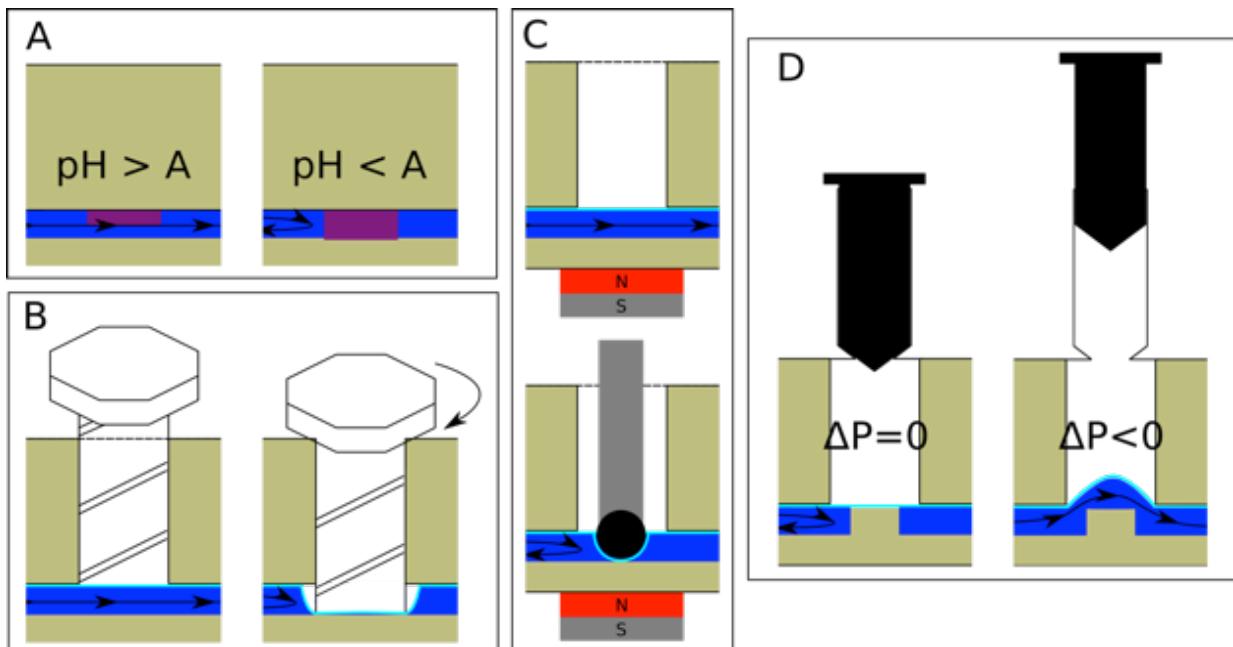


Figure 3.1 : Schéma des valves manuelles

(A) Valves manuelles chimiques sensibles au pH, (B) activées par une contrainte mécanique, (C) magnétiques et (D) pneumatiques à pression négative.

Les valves utilisant les variations chimiques environnementales sont généralement constituées d'hydrogels sensibles à la concentration d'une ou de plusieurs molécules (pH, etc.) dans l'environnement [36]. Elles pourraient théoriquement ouvrir et fermer automatiquement les valves en fonction des conditions environnementales. Toutefois, les hydrogels sont des substances relativement couteuses et les déformations qu'ils subissent sont relativement petites, ce qui fait qu'elles ne fonctionnent que dans des canaux de faible hauteur. De plus, la résistance de ce type de valves à la pression est relativement faible, ce qui en limite les applications.

Le second moyen de contrôler les valves, l'application d'une contrainte mécanique, repose sur le déplacement d'un corps afin de déplacer la membrane. L'un des moyens d'y parvenir est l'utilisation d'une vis dont l'extrémité est directement liée à la membrane [37]. Ainsi, en tournant la vis, il est possible d'ouvrir ou de fermer le canal. Ces valves sont simples à utiliser et possèdent une résistance élevée à la pression. Toutefois, l'intégration de la vis à l'ensemble du dispositif peut s'avérer complexe et la fermeture des valves est lente. De plus, ces valves ont comme avantage et inconvénient le fait de ne pas être binaires (ouvertes ou fermées), mais plutôt d'être à résistance variable en fonction du nombre de rotations effectués. Cela fait en sorte qu'il est difficile de savoir si les valves sont réellement fermées et s'il y a présence de fuites.

Le troisième moyen de contrôler les valves est l'utilisation d'une chambre de pression disposée au-dessus du canal, afin de déplacer la membrane. Ces valves peuvent être soit à pression positive [13], qui sont ouvertes par défaut, ou à pression négative [38], qui sont fermées par défaut. Ce dernier élément constitue un avantage majeur dans un contexte de culture cellulaire où il est important d'éviter les échanges indésirés entre les différentes populations de cellules. Ainsi, lorsqu'aucune composante n'est rattachée au système, les valves à pression négative se ferment automatiquement, empêchant la communication entre les chambres de culture. De plus, contrairement aux valves à pressions positives, ces valves n'imposent pas de pression sur la liaison entre les différents étages de PDMS, ce qui pourrait entraîner le bris du dispositif. L'emploi de valves pneumatiques nécessite généralement l'utilisation de pompes à pression afin de contrôler précisément la pression à l'intérieur de la chambre, mais il est possible d'en faire des valves manuelles en se servant de seringues dont le piston est fixé en position ouverte ou fermée pour introduire la variation de pression. Toutefois, la perméabilité du PDMS à l'oxygène aurait pu faire diminuer la variation de pression dans le temps. Ainsi, une expérience préliminaire utilisant une seringue de 10 mL dont le piston avait été fixé en position ouverte nous a permis d'observer qu'il était possible de maintenir une pression de -80 kPa sur une période de 24 h. Toutefois, les valves pneumatiques manuelles à pression négative possèdent une faible résistance à la pression et la nécessité d'employer une seringue peut rendre l'ensemble encombrant.

Le quatrième et dernier moyen de contrôler les valves est l'utilisation de la force magnétique afin de déplacer la membrane. Ce moyen repose sur l'utilisation d'un aimant disposé sous le canal et d'une tige ferromagnétique déposée au-dessus du canal, directement sur la

membrane pour fermer le canal et sur le retrait de l'une des deux composantes pour ouvrir le canal [39]. Ce moyen est simple à implémenter, possède une résistance élevée à la pression et permet la fermeture rapide de la valve. Toutefois, ce type de valves est ouvert par défaut, ce qui peut s'avérer problématique dans un contexte de culture cellulaire. Dans le cadre de ce projet, seules les valves pneumatiques manuelles à pression négative et les valves magnétiques manuelles furent explorées. Les prochaines sections décriront en détail les designs explorés et les expériences réalisées pour chacune de ces valves.

3.2 Valves manuelles pneumatiques

Afin de parvenir à réaliser un tel dispositif, il est nécessaire de lier au moins deux étages de PDMS moulés, en plus de la membrane. Les modèles des moules utilisés sont présentés à la Figure 3.2. L'objectif de ces modèles était d'expérimenter le fonctionnement des valves, ainsi que la possibilité d'avoir des canaux de pressurisation sur plusieurs niveaux, ce qui explique la complexité de l'assemblage réalisé. En plus des canaux et des chambres de pressurisation, on peut voir sur ces modèles une protubérance qui cause une déformation initiale de la membrane.

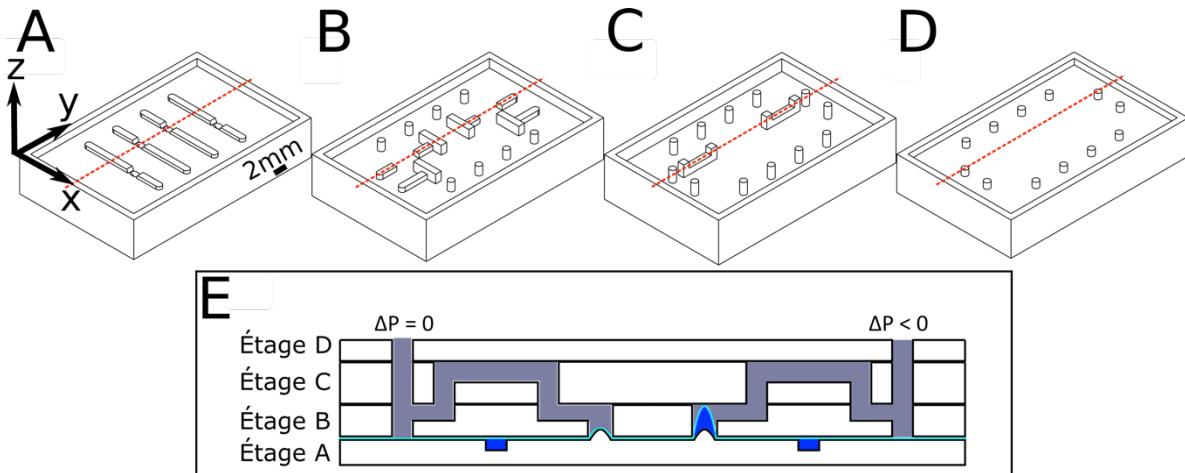


Figure 3.2 : Moules et assemblage de valves pneumatiques

(A) à (D) Modèles des moules utilisés pour réaliser le dispositif utilisant les valves pneumatique. (E) Les moules s'assemblent dans l'ordre avec la membrane (turquoise) liée entre les étages A et B. (E) représente la vue décrite par les pointillés sur les moules. On peut aussi y voir que la valve de gauche y est fermée, alors que celle de droite est ouverte.

L'objectif visé était de contraindre la membrane dans le but d'augmenter la résistance des valves à la pression. Toutefois, lors de la réalisation des dispositifs, il fut remarqué qu'au moment de la liaison de la membrane avec l'étage de PDMS comportant les canaux, la membrane se liait à la protubérance servant à fermer la valve, empêchant l'ouverture convenable de cette dernière par la suite. Pour cette raison et à cause du degré de complexité qui aurait été requis pour obtenir

des valves adressables individuellement, il fut décidé d'abandonner les essais sur ces valves et de concentrer les efforts sur les valves magnétiques manuelles.

3.3 Valves magnétiques manuelles

3.3.1 Fonctionnement

Les valves magnétiques manuelles présentent de nombreux avantages et très peu d'inconvénients, ce qui explique pourquoi elles ont été explorées lors de ce projet. La Figure 3.3 présente le design retenu pour ce projet, inspiré de Gaspar et al. (2008) [39]. Ce design se différencie de celui de Gaspar par plusieurs éléments, notamment la différence de taille et de forme des canaux utilisés, ceux de Gaspar étant de 25 μm avec une section rectangulaire, et le fait que la fermeture de la valve dans notre dispositif soit causée par l'ajout de la tige de métal, plutôt que de l'aimant.

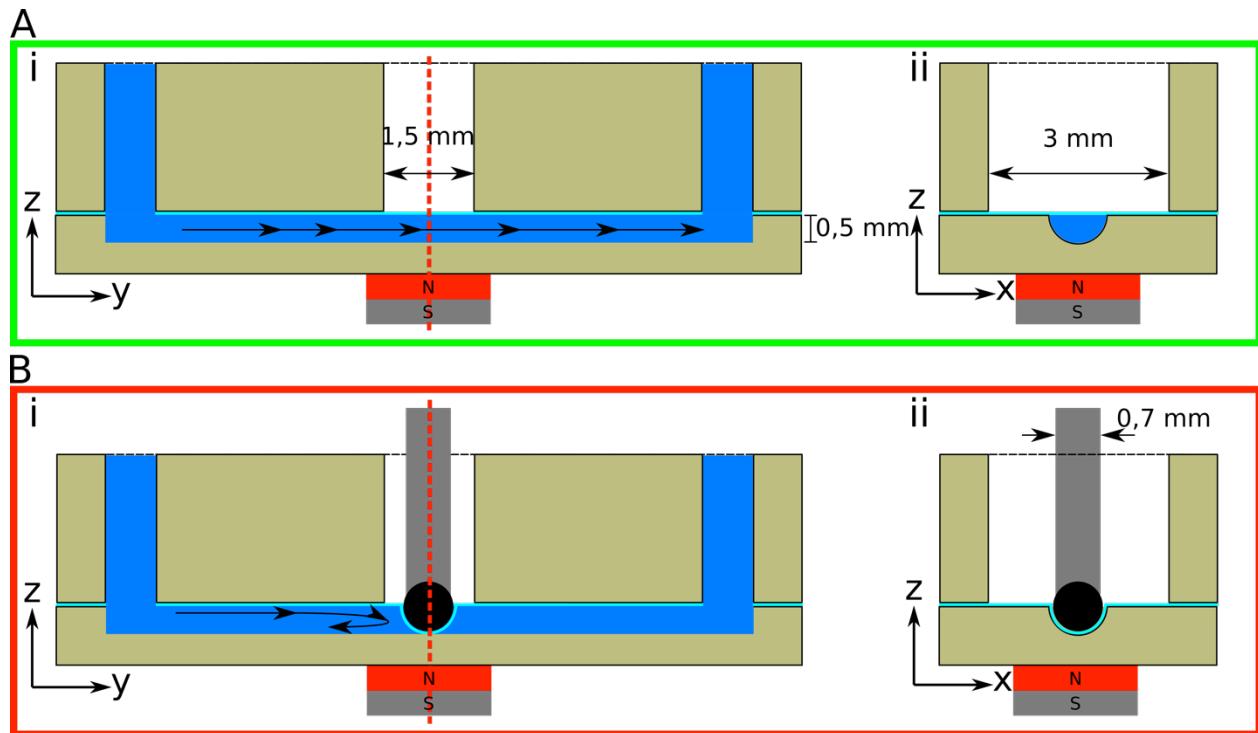


Figure 3.3 : Design des valves magnétiques manuelles

(A) Le dispositif est déposé sur un aimant aligné avec le centre de la valve. (B) Lorsque la tige ferromagnétique est approchée du dispositif, elle est attirée vers l'aimant, déformant ainsi la membrane (turquoise) et fermant le canal. Dans les deux cas, (i) une vue latérale du dispositif et (ii) une vue selon la ligne de coupe définie par les pointillés rouges sont représentées.

Le dispositif est composé de trois parties en PDMS, d'un aimant disposé sous le canal principal au niveau de la valve et d'une tige métallique. En déposant la tige métallique dans l'ouverture présente dans l'étage du haut, elle est attirée vers l'aimant, causant une pression sur la membrane et entraînant la fermeture de la valve. Par la suite, le canal peut être ouvert en retirant la tige du dispositif.

3.3.2 Design et fabrication

Les moules utilisés pour la fabrication des dispositifs permettant d'évaluer la résistance des valves sont présentés à la Figure 3.5. Ils sont divisés en deux parties : l'étage comportant les canaux et l'étage comportant les ouvertures pour les entrées, les sorties et les valves. Les étages possèdent respectivement une hauteur de 1,1 et 3 mm, de manière à avoir la même distance entre la tige ferromagnétique et l'aimant que celle qui fut utilisée pour le réseau de chambres de culture de sphéroïdes. La hauteur de l'étage comportant les canaux est particulièrement importante, puisqu'elle définit la distance entre la tige ferromagnétique et l'aimant, qui affecte la force magnétique entre ces deux corps et la résistance de la valve.

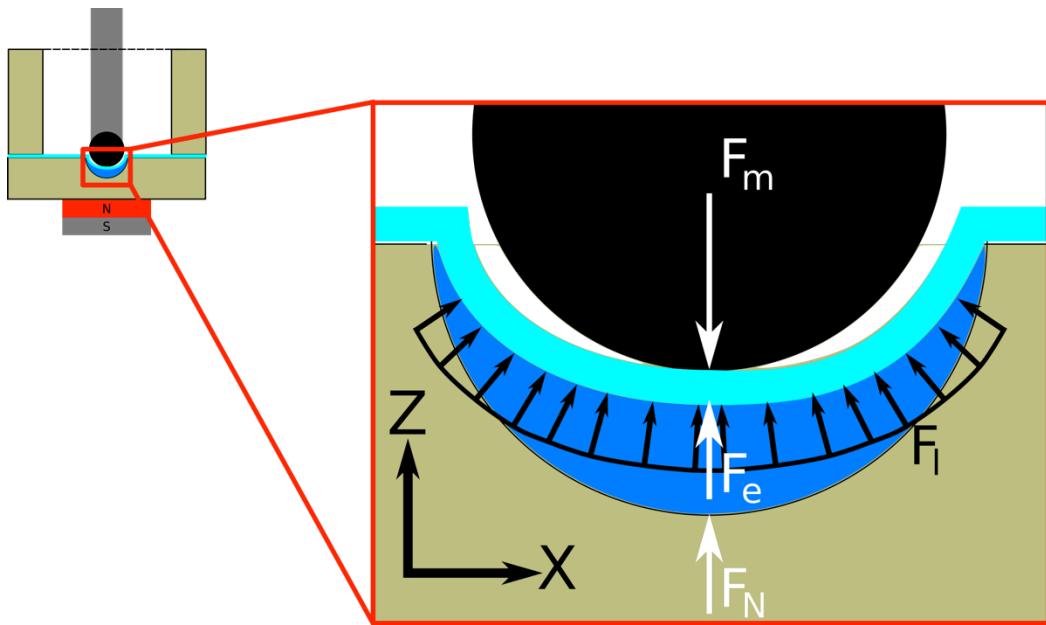


Figure 3.4 : Diagramme des forces s'appliquant au niveau de la membrane

En effet, lors de la fermeture d'une valve, quatre forces sont en jeu (Figure 3.4) : la force magnétique causée par l'attraction entre la tige ferromagnétique et l'aimant (F_m), la force élastique exercée par la membrane causée par son déplacement (F_e), la force (ou pression)

exercée par le fluide présent dans le canal (F_l) et la force normale exercée entre l'aimant et la tige ferromagnétique (F_N). Tant que la force normale est non-nulle, la valve peut être considérée comme fermée. Ainsi, tel que décrit par l'Équation 1, plus la force magnétique exercée est élevée et plus la force élastique exercée est faible, plus la résistance de la membrane à la pression ($F_{l\ max}$) sera élevée.

$$\sum F_z = 0 = -F_m + F_N + F_e + F_l \Rightarrow F_N + F_l = F_m - F_e \Rightarrow F_{l\ max} = F_m - F_e \quad (3.1)$$

Selon les données récoltées à l'aide de simulations d'éléments finis sur COMSOL par Simon Guichandut, stagiaire à l'été 2016, un déplacement de 0,3 ou 0,5 mm d'une membrane possédant un module de Young de 1 MPa, correspond à une force F_e de 0,06 ou 0,1 N. Ainsi, pour que la membrane soit fermée, la force F_m devrait être égale ou supérieure à cette valeur. Les aimants utilisés pour ce faire furent des aimants cubiques composés d'un alliage de néodyme, de fer et de bore (NdFeB) ayant un champ magnétique à la surface de 0,65 T (B444 N52, K&J Magnetics, Pipersville, PA) et devaient être à 0,8 mm ou moins de la surface de la tige ferromagnétique afin de fournir une force magnétique égale ou supérieure à 0,1 N¹. La distance entre l'extrémité de l'aimant et de la tige étant d'environ 0,715 mm lorsque cette dernière est au fond du canal, la résistance des valves à la pression était non-nulle. Cette résistance sera évaluée plus en détail dans la Section 3.3.3.

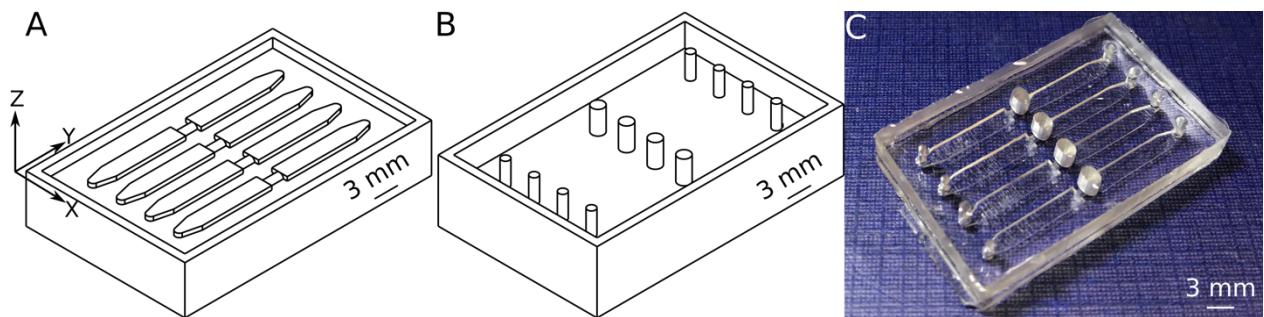


Figure 3.5 : Moules des valves magnétiques

(A) Moules de l'étage contenant les canaux et (B) de l'étage contenant les entrées, les sorties et les ouvertures pour les valves. (C) Photo du dispositif assemblé.

Les moules pour les valves individuelles ont été réalisés avec l'Asiga Freeform Pico et le moulage et l'assemblage se firent en suivant la procédure décrite au Chapitre 2, soit en utilisant

¹ Valeurs trouvées à partir des données recueillies lors du stage de Simon Guichandut

du PDMS 10:1 durci pendant 1 h à 80 °C pour le corps du dispositif (étages en beige sur la Figure 3.3) et du PDMS 20 :1 durci pendant 72h à 20°C pour la membrane et en liant les étages suite à une exposition de 30 s au plasma atmosphérique. Les liaisons ont été réalisées dans l'ordre suivant : étage des ouvertures avec membrane, puis l'autre côté de la membrane avec l'étage des canaux (Figure 2.7). Cet ordre a été choisi dans le but de limiter la surface de la membrane initialement suspendue ou non-liée, limitant la formation de plis et facilitant son détachement.

Dans le cadre du projet, deux types de tiges ferromagnétiques ont été utilisées : des tiges dont l'extrémité était recouverte de PDMS magnétique ou PDMSm (Figure 3.6 A) et d'autres dont l'extrémité était inchangée (Figure 3.6 B). Dans les deux cas, les tiges ont été fabriquées à partir des extrémités de trombones en fer de 0,7 mm de diamètre sectionnées à 2 cm de longueur, créant une extrémité pointue et une extrémité plate. L'extrémité plate était ensuite recouverte de PDMSm dans les tiges modifiées. Le PDMSm utilisé est constitué de PDMS 10:1 mélangé à des particules de magnétite (Fe_3O_4) à un ratio massique de 50/50 [40,41]. Par la suite, l'extrémité plate des tiges est trempée dans le mélange, avant d'être insérée dans le four à 80°C pour 1 h afin de faire durcir le PDMSm.

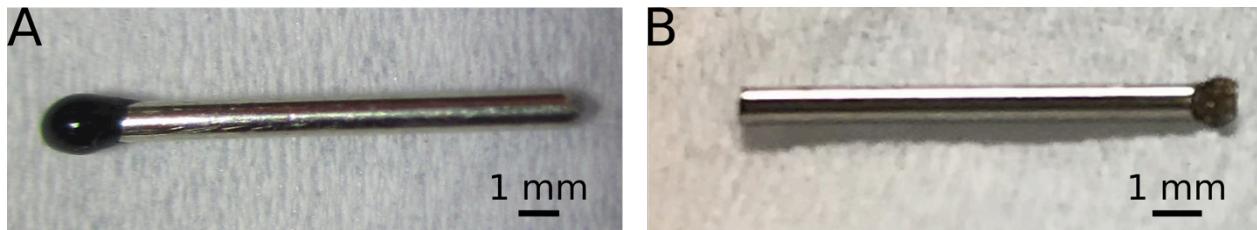


Figure 3.6 : Types de tiges ferromagnétiques

(A) Tige en fer de 0,7 mm de diamètre dont l'extrémité plate (gauche) fut recouverte de PDMSm (noir).
(B) Tige en fer de 0,7 mm de diamètre inchangée (extrémité plate à gauche).

Ensuite, les dispositifs ont été soumis à un traitement dans le but d'en rendre les surfaces hydrophiles, évitant ainsi l'adhérence des cellules à leurs parois et permettant la formation de sphéroïdes [42]. Le traitement suivi est le suivant :

- Remplir les canaux du dispositif d'éthanol, dans le but de bien mouiller les parois et éviter la formation de bulles d'air;
- Vider les canaux par aspiration;
- Remplir les canaux d'une solution de PluronicTM à 10 mg/mL;
- Incuber 2 h à 37°C.

Une fois ce traitement subi, les dispositifs ont été soumis à différentes conditions reconnues pour causer un durcissement du PDMS afin d'évaluer la résistance des valves.

3.3.3 Résistance

Tout d'abord, l'étanchéité des différentes formes de canal a été évaluée afin de déterminer le meilleur design. Par la suite, pour le design retenu, des dispositifs ont été soumis à des traitements qui sont fréquents dans un contexte de culture cellulaire et d'essais combinatoires en oncologie, le tout pour s'assurer du bon fonctionnement des valves malgré les différentes conditions auxquelles elles pourraient être soumises. Leur résistance à la pression était ensuite évaluée afin de confirmer leur résistance aux traitements. Finalement, leur capacité à fonctionner dans un incubateur pour prévenir la diffusion de petites molécules a été évaluée.

3.3.3.1 Choix de forme de canal

Des dispositifs correspondant aux moules présentés à la Figure 3.5, mais avec différentes formes de canaux ont été réalisés afin d'en évaluer la résistance à la pression. Les formes testées sont des canaux ayant une section triangulaire, ovaloïde (semi-circulaire avec une section rectangulaire de 0,4 mm au milieu) et semi-circulaire de 0,3 mm de rayon et de 0,5 mm de rayon. Les différents dispositifs ont été testés avec une pompe à pression Elveflow AF1 Dual Unit (Elveflow, Paris, France) et des tiges métalliques régulières. Le **Error! Reference source not found.** présente les résultats obtenus pour chacun des designs testés.

Tableau 3.2 : Résistance des valves à la pression en fonction de la forme du canal

Forme du canal	Triangulaire	Ovaloïde	Semi-circulaire (0,3 mm)	Semi-circulaire (0,5 mm)
Résistance à la pression (kPa)	<1	<1	<1	1,4

On y voit clairement que le canal semi-cylindrique de 0,5 mm de rayon présente les meilleurs résultats, ce qui explique pourquoi ce design a été retenu pour la suite du projet. Il est important de mentionner qu'au moment de ces tests, les membranes étaient formées à partir de PDMS 10 :1, étaient de 200 µm d'épaisseur et durcissaient pendant 2h à 80°C. De plus, les

aimants utilisés étaient des aimants rectangulaires ayant un champ magnétique à la surface de 0,47 T (BX022, K&J Magnetics, Pipersville, PA), alors que ceux utilisés par la suite en possédaient une de 0,65 T (B444 N52, K&J Magnetics, Pipersville, PA), ce qui explique la différence entre les résultats obtenus ici et ceux qui seront présentés dans les prochaines sections.

3.3.3.2 Choix des conditions à évaluer

Les valves ont été soumises à quatre différentes conditions afin d'évaluer leur résistance. La première évaluée est l'influence du type de tige ferromagnétique utilisée. En effet, bien que les tiges recouvertes de PDMSm possèdent une forte teneur en fer, il était fort possible que leur utilisation affecte la résistance des valves, puisque cette teneur est inférieure à celle de tiges entièrement composées de fer. Toutefois, l'extrémité des tiges recouvertes étant arrondie, elle épousait mieux les formes du canal que les tiges régulières, permettant possiblement une meilleure étanchéité.

La seconde condition à être évaluée est l'influence du temps d'incubation sur la résistance des valves. En effet, comme mentionné dans le Tableau 2.5, l'augmentation de la température accélère la formation de liaisons à l'intérieur du PDMS, causant ainsi une augmentation de son module de Young [29]. Ainsi, même si la température d'un incubateur (~37°C) est inférieure à celle utilisée pour le durcissement du PDMS (~80°C), il est fort possible qu'un séjour prolongé cause un durcissement considérable de la membrane. La culture cellulaire nécessitant généralement des temps d'incubation d'au moins une semaine, trois temps d'incubation (0, 3 et 7 jours) furent testés afin d'en vérifier l'effet sur les valves.

La troisième condition testée est l'influence de la RT sur la résistance des valves. En effet, de manière analogue à ce qui peut être observé avec une augmentation de la température, certains chercheurs ont remarqué une augmentation du nombre de liaisons dans le PDMS suite à une exposition à de fortes doses de RT [43]. Ainsi, comme le dispositif est destiné à une utilisation à des doses de RT pouvant aller jusqu'à 8 Gy, sa résistance à la pression fut évaluée après l'exposition à des doses de 0, 2, et 8 Gy. De manière analogue, il aurait pu être justifié de tester l'influence de la chimiothérapie (CT), mais comme il existe une multitude d'agents de CT agissant tous de manière différente et qu'aucune évidence d'interaction entre ces agent et le durcissement du PDMS n'a été rapportée à ce jour, il a été décidé de la négliger dans le cadre de ce travail.

La quatrième et dernière condition testée est l'influence de l'état de la valve (ouverte ou fermée) pendant son incubation. En effet, lors d'expériences préliminaires, il a été remarqué que la résistance des valves semblait plus élevée lorsqu'elles étaient maintenues fermées lors de l'incubation. Pour cette raison, cette condition fut évaluée plus en détail afin de tenter de mieux la comprendre.

3.3.3.3 Protocole

Lors de l'ensemble des tests, les dispositifs présentés à la Figure 3.5 étaient remplis avec du milieu cellulaire DMEM/F12 pendant les traitements (RT et incubation). Sauf indication contraire, les dispositifs ont été exposés à une dose de RT de 8 Gy à l'aide d'un appareil Gammacell 3000 (Best Theratronics, Ottawa, Canada), avant de séjourner 7 jours dans un incubateur à 37°C avec les valves ouvertes. Par la suite, l'évaluation de la résistance des valves a été effectuée en utilisant des tiges recouvertes de PDMSm. Les dispositifs étaient assemblés le jour 0, subissaient le traitement de PluronicTM, étaient soumis à la RT au jour 1, séjournaient dans l'incubateur du jour 1 au jour X (en fonction du temps d'incubation désiré) et étaient testés au jour 7.

La résistance des valves a été évaluée un canal à la fois grâce à une pompe pneumatique Elveflow AF1 Dual Unit (Elveflow, Paris, France) pouvant aller de -100 à 100 kPa. Pour évaluer la résistance, le canal principal était vidé, puis rempli d'une solution d'eau et de colorant alimentaire bleu jusqu'à ce que le liquide dépasse la valve (Figure 3.7 A). Par la suite, la valve était fermée (Figure 3.7 B) et la pression de la pompe augmentée jusqu'à ce qu'un mouvement soit détecté au niveau du ménisque, de l'autre côté de la valve (Figure 3.7 C). Lors des tests, la pression était augmentée à toutes les 30 s par incrément de 1 kPa de 0 à 10 kPa et par incrément de 10 kPa de 10 à 100 kPa.

La capacité des valves à empêcher la diffusion de petites molécules dans un contexte normal a aussi été évaluée. Pour y parvenir, les dispositifs subirent les traitements mentionnés ci-haut (RT 8 Gy, après traitement de PluronicTM), avant d'être remplis d'eau. Par la suite, une solution de fluorescéine (M422-05, JT Baker, Center Valley, PA) était injectée par l'une des extrémités jusqu'à ce qu'elle atteigne le début de la valve. Sur un même dispositif, seule la moitié des valves étaient fermées, dans le but de pouvoir comparer les résultats obtenus. Finalement, les dispositifs étaient incubés à 37°C pendant 7 jours et imagés en fluorescence avec un stéréoscope

Olympus SZX16 (Olympus, Tokyo, Japon) 1h, 168h (7 jours) et 169h après l'injection de fluorescéine. Toutes les valves étaient ouvertes après avoir imaginé le dispositif à 168h.

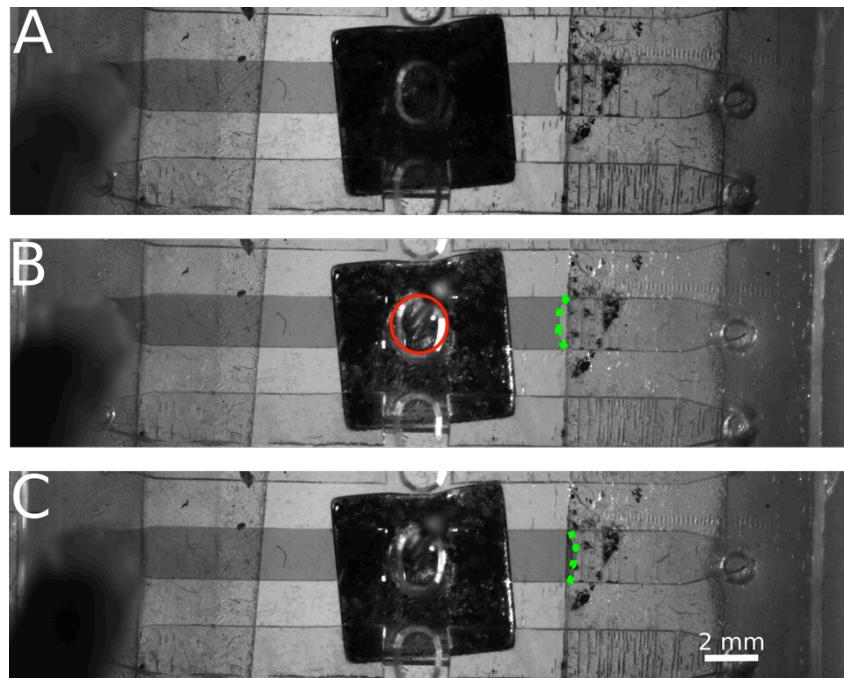


Figure 3.7 : Procédure de test de résistance des valves

(A) Le canal est rempli jusqu'à ce que l'eau colorée (gris foncé sur l'image) dépasse la valve, puis (B) la tige métallique (dans le cercle rouge) est déposée pour fermer la valve. Ensuite, la pression est augmentée progressivement (C) jusqu'à ce qu'un mouvement soit observé au niveau du ménisque (pointillé vert).

3.3.3.4 Analyse et résultats

La Figure 3.8 présente l'ensemble des résultats obtenus pour les conditions principales (les données brutes sont disponibles à l'Annexe B). Pour faciliter l'analyse de ces résultats, deux seuils ont été définis, le seuil de fonctionnement (2 kPa) et le seuil d'étanchéité supérieure (10 kPa). Ces valeurs correspondent respectivement à la pression exercée par une colonne d'eau de 20 cm et de 1 m. Elles ont été choisies parce qu'un dispositif microfluidique ne dépasse généralement pas les 10 cm de longueur, ce qui fait qu'en le tournant à 90°, la pression maximale pouvant être atteinte est de 1 kPa. Ensuite, en ajoutant un facteur de sécurité de 2, on trouve un seuil de 2 kPa, soit la résistance minimale que devrait avoir une valve dans le but d'en garantir l'étanchéité dans des conditions normales. Le second seuil correspond plutôt à la résistance nécessaire pour pouvoir effectuer des opérations dont la charge sur les valves est plus élevée, comme appuyer sur une section du dispositif pour en chasser les bulles d'air, tout en garantissant l'étanchéité du système. Lors de certains tests, une délamination du PDMS fut observée pour des

pressions avoisinant les 60 kPa. Dans ces cas, la valeur de résistance retenue fut celle précédant l'observation de ce phénomène, même s'il ne relevait pas directement de la résistance de la valve.

Facteurs affectant la résistance des valves à la pression

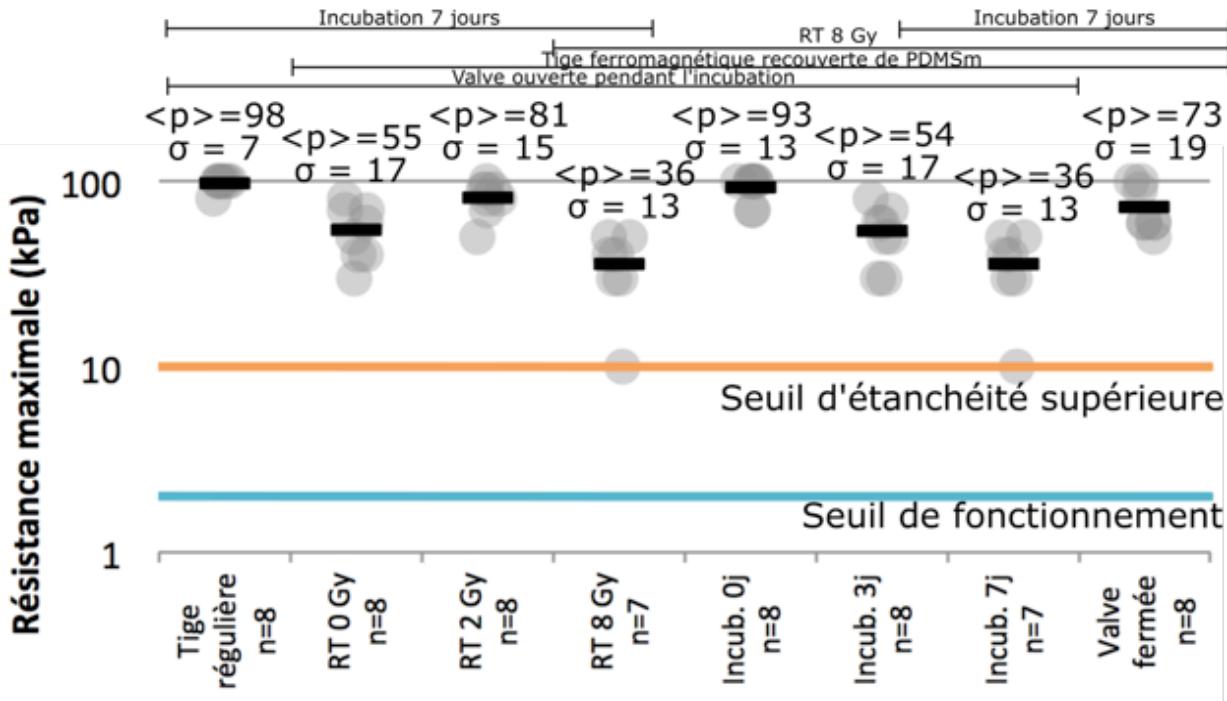


Figure 3.8 : Ensemble des facteurs affectant la résistance des valves à la pression

3.3.3.4.1 Tige ferromagnétique

Le premier aspect à être évalué est l'influence du type de tige utilisée (régulière ou recouverte de PDMSm) sur la résistance maximale des valves (Figure 3.9 A). Les valves utilisant les tiges régulières présentent une résistance supérieure à celles utilisant des tiges recouvertes de PDMSm. La force magnétique étant affectée par la densité de particules magnétiques présentes dans les corps ferromagnétiques utilisés et la distance entre ceux-ci et l'aimant, il est normal que la force d'attraction soit plus faible chez les tiges recouvertes de PDMSm, puisque celui-ci augmente la distance entre la tige et l'aimant. Il semble aussi que cette différence soit plus importante pour fermer la valve que la forme de l'extrémité de la tige, la tige normale ayant une extrémité plate, alors que celle de PDMSm ayant une extrémité arrondie.

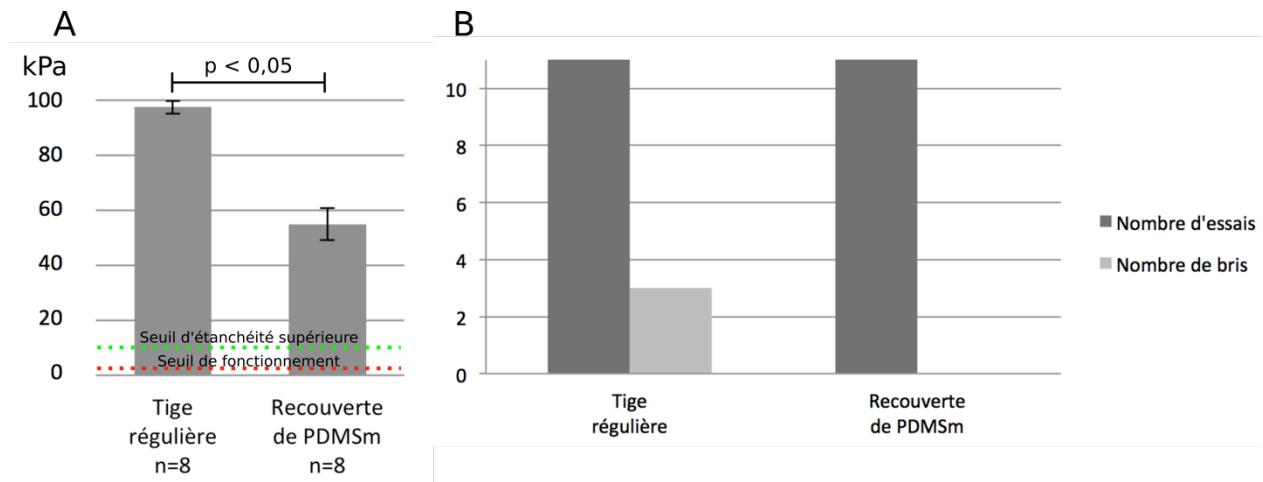


Figure 3.9 : Résistance en fonction du type de tige ferromagnétique utilisée

(A) Résistance des valves au jour 7 après une incubation de 7 jours à 37°C avec les valves ouvertes et aucune RT. (B) Occurrence de bris chez des valves ayant séjourné 2 jours à 90°C.

Toutefois, il a été remarqué, pour des températures plus élevées, que l'utilisation de tiges régulières avait tendance à causer plus de déchirures dans la membrane que celle de tiges recouvertes de PDMSm (Figure 3.9 B). Ce phénomène est principalement causé par le fait que les tiges régulières présentent des bords plus effilés que celles recouvertes de PDMSm. Ainsi, comme dans les deux cas la résistance obtenue était supérieure au seuil d'étanchéité supérieure, il a été décidé que la fiabilité était plus importante qu'une résistance plus élevée, ce qui explique pourquoi nous avons décidé d'utiliser des tiges dont l'extrémité était recouverte de PDMSm pour le reste des travaux.

3.3.3.4.2 Température

Le second aspect à être évalué est l'influence de la température sur la résistance des valves. Comme le PDMS a tendance à se durcir dans le temps, un processus accéléré par l'augmentation de la température, il n'est pas surprenant que l'incubation des échantillons à 37°C entraîne une diminution de la résistance des valves qui y séjournent le plus longtemps (Figure 3.10). Cela s'explique par le fait que la flexibilité affecte directement la résistance de la membrane à la pression, une membrane plus flexible étant plus résistante qu'une membrane rigide. En effet, si l'on se réfère à l'Équation 1, plus la membrane est rigide, plus sa force élastique sera grande et, comme la force magnétique reste inchangée, plus la résistance à la pression sera faible. Toutefois, dans tous les cas, la résistance observée était supérieure ou égale au seuil d'étanchéité supérieure, ce qui signifie que les dispositifs devraient pouvoir séjourner jusqu'à 7 jours dans un incubateur, sans que l'étanchéité des valves ne soit compromise.

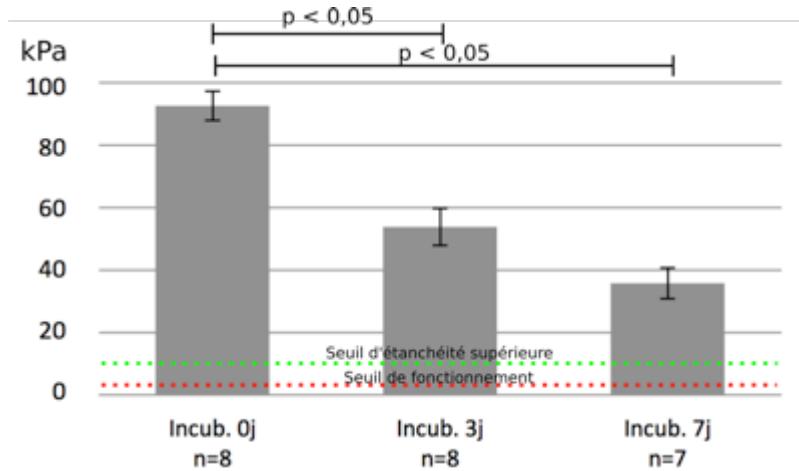


Figure 3.10 : Influence du temps d’incubation sur la résistance des valves

Dans tous les cas, les systèmes furent exposés à une dose de RT de 8 Gy, incubés à 37°C avec les valves ouvertes et testés avec des tiges recouvertes de PDMSm au jour 7.

3.3.3.4.3 Radiothérapie

Le troisième aspect à être évalué est l'influence de la RT sur la résistance des valves. Conformément à ce qui était attendu, l'utilisation de la RT semble théoriquement avoir de l'influence sur la résistance des valves, puisqu'une différence significative entre les échantillons a été observée (Figure 3.11). Toutefois, les résultats observés divergent de ce qui était attendu, puisque la résistance des valves a augmenté après une exposition à une faible dose de RT (2 Gy). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les doses de RT appliquées ne soient pas du même ordre de grandeur que celles de Palsule et al. [43], où les doses de RT utilisées étaient de l'ordre du kGy. Une hypothèse pouvant expliquer cette différence serait qu'à faible dose, la RT endommage plus rapidement les liaisons du PDMS qu'elle n'en forme de nouvelles, augmentant sa flexibilité et expliquant l'augmentation de la résistance, alors qu'à plus forte dose, l'effet inverse serait observé. Toutefois, de plus amples recherches seraient nécessaires afin de confirmer cette hypothèse. Cependant, comme dans tous les cas la résistance des valves était supérieure ou égale au seuil d'étanchéité supérieure, il nous est permis d'avancer que les valves peuvent résister à des traitements de RT d'au moins 8 Gy.

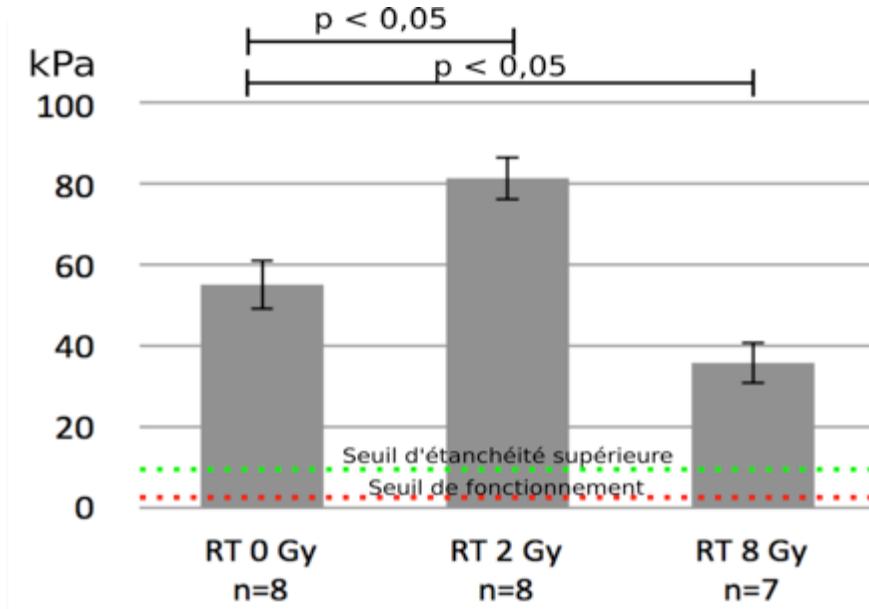


Figure 3.11 : Influence de la RT sur la résistance des valves

Dans tous les cas, les systèmes furent incubés à 37°C avec les valves ouvertes pendant 7 jours et testés avec des tiges recouvertes de PDMSm au jour 7.

3.3.3.4.4 État des valves

Le quatrième aspect évalué est l'influence de l'état des valves (ouvertes ou fermées) lors de l'incubation sur leur résistance (Figure 3.12 A). Une différence significative entre les deux états a été observée et s'explique par le fait que, lors de l'incubation, des liaisons semblent se former entre les molécules des valves fermées, ce qui cause une déformation permanente dans la membrane, comme on peut l'observer dans la Figure 3.12 B. Ainsi, comme le déplacement requis pour fermer la membrane devient moins important (distance entre les lignes rouges et bleues), la résistance de la valve à la pression est plus importante. De plus, suite aux expériences sur l'état des valves, la capacité des valves qui étaient maintenues fermées lors de l'incubation à laisser des fluides circuler lorsqu'ouvertes a été évaluée. Les valves ont tout d'abord été remplies d'eau, puis, une goutte de colorant alimentaire a été déposée à l'une des extrémités des valves. En moins d'une minute, celui-ci diffusa dans l'entièreté du canal, confirmant l'ouverture des valves. Ces résultats nous permettent d'avancer que, à moins que ce ne soit essentiel à l'expérience, les valves devraient toujours être fermées lors de l'incubation, permettant de maintenir une résistance à la pression plus élevée.

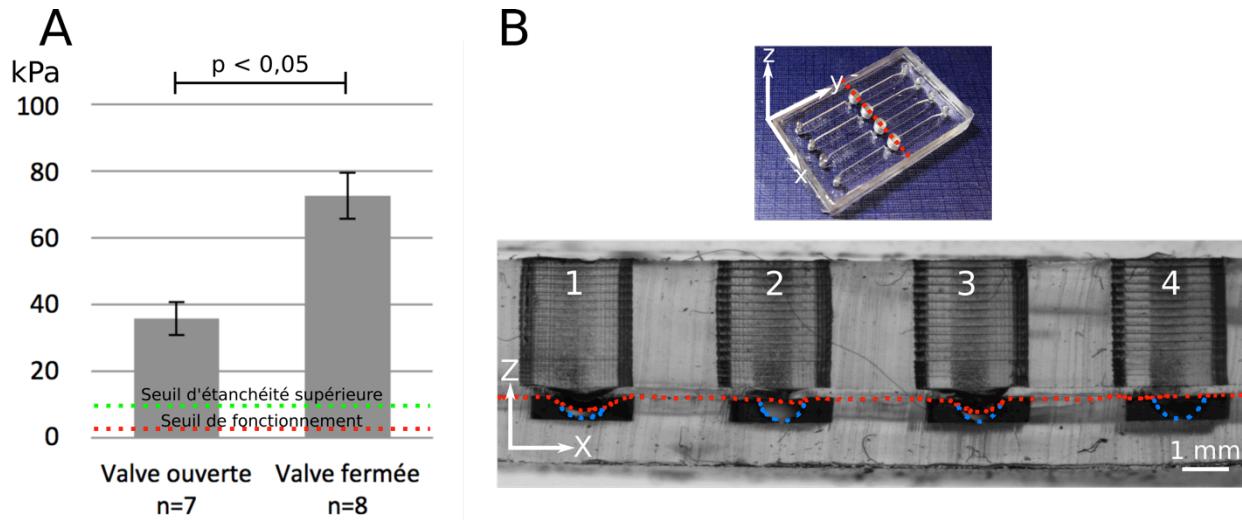


Figure 3.12 : Influence de l'état des valves pendant l'incubation sur la résistance des valves

(A) Résistance des valves au jour 7 avec des tiges recouvertes de PDMSm après une incubation de 7 jours à 37°C et une exposition de 8 Gy à la RT au jour 0. (B) Vue au microscope d'un système coupé au milieu de la valve (pointillé rouge sur la photo). La ligne pointillée rouge représente le côté inférieur de la membrane et la ligne pointillée bleue représente le fond du canal constituant la valve. Les valves 1 et 3 étaient fermées pendant l'incubation, alors que les valves 2 et 4 ont été maintenues ouvertes.

3.3.3.4.5 Diffusion

En ce qui concerne la prévention de la diffusion de particules dans un contexte normal d'utilisation, la Figure 3.13 nous permet de remarquer que les valves permettent de prévenir la diffusion de la fluorescéine, qui a une masse moléculaire de 333 Da [44]. Cela signifie que la diffusion de molécules de communication cellulaire comme les cytokines, dont la masse moléculaire est de 8 à 50 kDa, devrait aussi être arrêtée par les valves, confirmant l'absence de contacts indirects indésirés entre les chambres de culture. Toutefois, lors de cette expérience, il a été remarqué que, comme le PDMS est perméable aux gaz, il permet l'évaporation des liquides à l'intérieur même des canaux, ce qui peut introduire de l'air dans le système et en troubler le bon fonctionnement. Ainsi, cette expérience a permis de mettre en valeur l'importance de changer fréquemment le milieu cellulaire pour éviter l'évaporation des solutions présentes dans le système. Les résultats présentés ont donc été difficiles à obtenir, puisque la nature même de l'expérience empêchait le changement de solutions dans les canaux.

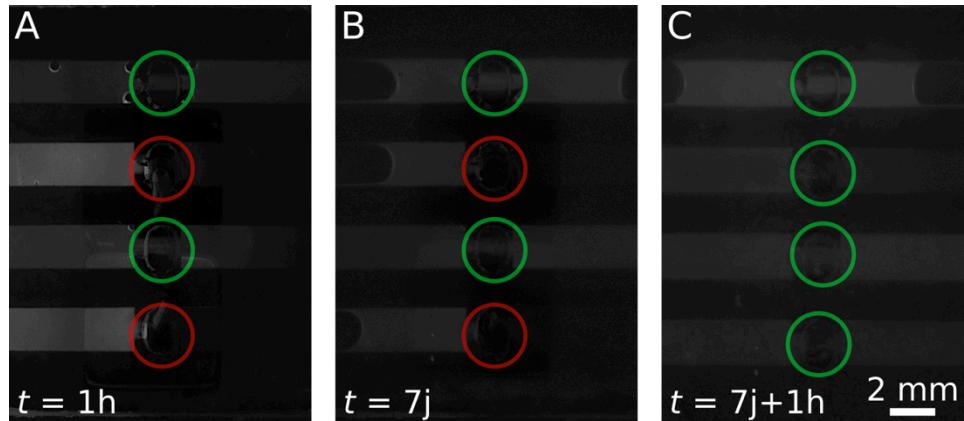


Figure 3.13 : Image en fluorescence de la diffusion de fluorescéine à travers les valves

Les cercles verts indiquent les valves ouvertes au moment de prendre l'image et les cercles rouges celles qui étaient fermées.

Tous les résultats obtenus mènent à la conclusion que les valves créées permettent de prévenir le passage de fluides et la diffusion de molécules à des pressions plus que suffisantes pour la culture cellulaire. La prochaine étape du projet a donc été d'implémenter les valves créées sur un dispositif permettant la culture cellulaire et la formation de sphéroïdes, soit un réseau de chambres de culture de sphéroïdes (RCCS).

CHAPITRE 4 RÉSEAU DE CHAMBRES DE CULTURE DE SPHÉROÏDES

Une fois les valves fabriquées et fonctionnelles, la prochaine étape a été de s'en servir pour réaliser un réseau de chambres de culture de sphéroïdes. Ce chapitre portera d'abord sur les techniques et aspects de design permettant la conception d'un tel dispositif, avant d'étudier la capacité du dispositif à contrôler la direction du liquide et finalement de tester ses propriétés afin de faire la culture de véritables sphéroïdes.

4.1 Design

4.1.1 RCCS

La première contrainte de design du RCCS est sa capacité à produire des sphéroïdes. Pour y parvenir, le moyen le plus simple est de créer des canaux dont le fond contient des puits de quelques centaines de microns [16], puis de fonctionnaliser la surface de manière à ce qu'elle soit hydrophile. Par la suite, en insérant des cellules en suspension dans le système, ces dernières sédimentent au fond des puits et, comme les cellules interagissent plus fortement entre elles qu'avec la surface du dispositif, elles s'agrègent, formant un sphéroïde. La taille des puits utilisés est cruciale, puisqu'elle affecte directement la taille maximale que peuvent atteindre les sphéroïdes, ainsi que leur stabilité dans le système. Ainsi, les puits devraient être cubiques et être de quelques centaines de microns d'arrête, des puits trop grands (entre 0,5 et 1 mm en fonction de la lignée cellulaire utilisée) pouvant entraîner la formation de plus d'un sphéroïde par puits, causant une augmentation importante de la variabilité entre la taille des sphéroïdes. Dans le cas de notre système, cette taille affecte aussi la distance entre la tige ferromagnétique des valves et l'aimant disposé sous le système. Ainsi, dans le but de maximiser la force magnétique exercée, cette taille a été choisie comme étant la plus petite réalisable par l'imprimante 3D utilisée, l'Asiga Pro 2. Cette imprimante possède, selon le fabricant, une résolution de 50 µm, soit 23 µm de plus que l'Asiga Freeform Pico dont la résolution a été définie dans le Chapitre 2. Pour cette raison, nous avons décidé de faire des puits cubiques de 300 µm d'arrête séparés par 300 µm. En choisissant cette dimension et en considérant que pour éviter les déchirures il doit y avoir au moins 300 µm de PDMS au-dessus des structures présentes dans le moule, il est possible

d'obtenir une épaisseur de 1,1 mm pour l'étage comportant les canaux, ce qui représente la même épaisseur que celle à laquelle les tests de résistance des valves ont été effectués. Avec une telle épaisseur totale, une membrane de 0,115 mm et des canaux de 0,5 mm de rayon, la distance entre l'aimant et la tige métallique est d'environ 0,715 mm, ce qui signifie que la force magnétique entre ces deux corps est supérieure à 0,1 N, ce qui est suffisant pour fermer la valve.

La seconde condition est imposée par l'aire d'impression de l'imprimante 3D utilisée, soit 94 mm×53 mm. De plus, comme la pièce ainsi réalisée est un moule, elle doit posséder des parois d'une épaisseur minimale de 1 mm, ce qui diminue l'aire maximale d'impression à 92 mm×51 mm. Afin de faciliter l'assemblage du dispositif, une marge d'au moins 3 mm devrait être respectée entre les éléments du dispositif et les parois. En considérant ces contraintes, un premier design a été réalisé, tel qu'illustré à la Figure 4.1. Ce design est constitué de deux sections de 25 mm × 75 mm présentes sur le même moule et qui étaient séparées d'une paroi de 1 mm. Ces dimensions ont été choisies car elles permettent l'impression des deux étages nécessaires à la construction du dispositif sur un seul moule, diminuant ainsi le temps d'impression de moitié, en plus de correspondre à la taille d'une lame de verre standard. Cette taille aurait permis de faciliter son adoption par les utilisateurs, ainsi que son utilisation sur des appareils prévus pour recevoir des échantillons de la taille d'une lame de verre. La première section est celle de l'étage contenant les canaux et les chambres de culture et est constituée de trois canaux horizontaux et quatre canaux verticaux de section semi-circulaire de 0,5 mm de rayon. La deuxième section est celle de l'étage des entrées/sorties et est composée d'une série d'ouvertures de 3,5 mm pour les entrées et les sorties, ainsi que d'ouvertures circulaires de 1,5 mm pour les valves. Les chambres de culture de ce premier design sont de forme rectangulaire (12,2 mm×2,1 mm) et contiennent 48 trous chacune. Elles sont distancées les unes des autres de respectivement 2,1 mm et 2 mm dans le sens de la longueur et de la largeur.

Ce premier design a été testé en laboratoire pour la culture de sphéroïdes en utilisant la lignée STS117 issue de sarcomes des tissus mous, une variété de cancer reconnue pour sa susceptibilité aux traitements de RT (plus de détails à la Section 4.4) [45]. Par contre, lors de son opération, il a été remarqué que le fluide avait de la difficulté à atteindre certaines sections du dispositif, surtout lorsqu'il était introduit par les canaux verticaux. Cela peut s'expliquer par l'importante différence de taille entre l'entrée du canal (1 mm) et la chambre de culture (12,2 mm). De plus, la distance entre les chambres de culture était trop petite par rapport à la

résolution des projecteurs de rayons gamma utilisés pour les traitements de RT qui est de plusieurs mm. Finalement, lors du moulage du PDMS et du séjour du moule dans le four, la résine avait tendance à se déformer et à se replier sur elle-même, causant des différences entre l'épaisseur d'un même étage de PDMS (quelques centaines de microns), affectant grandement la force magnétique entre l'aimant et la tige métallique et la résistance de la valve. Un autre inconvénient de ce design était l'absence de valve au niveau des ports d'entrée et de sortie verticaux qui complexifiait le remplissage du dispositif.

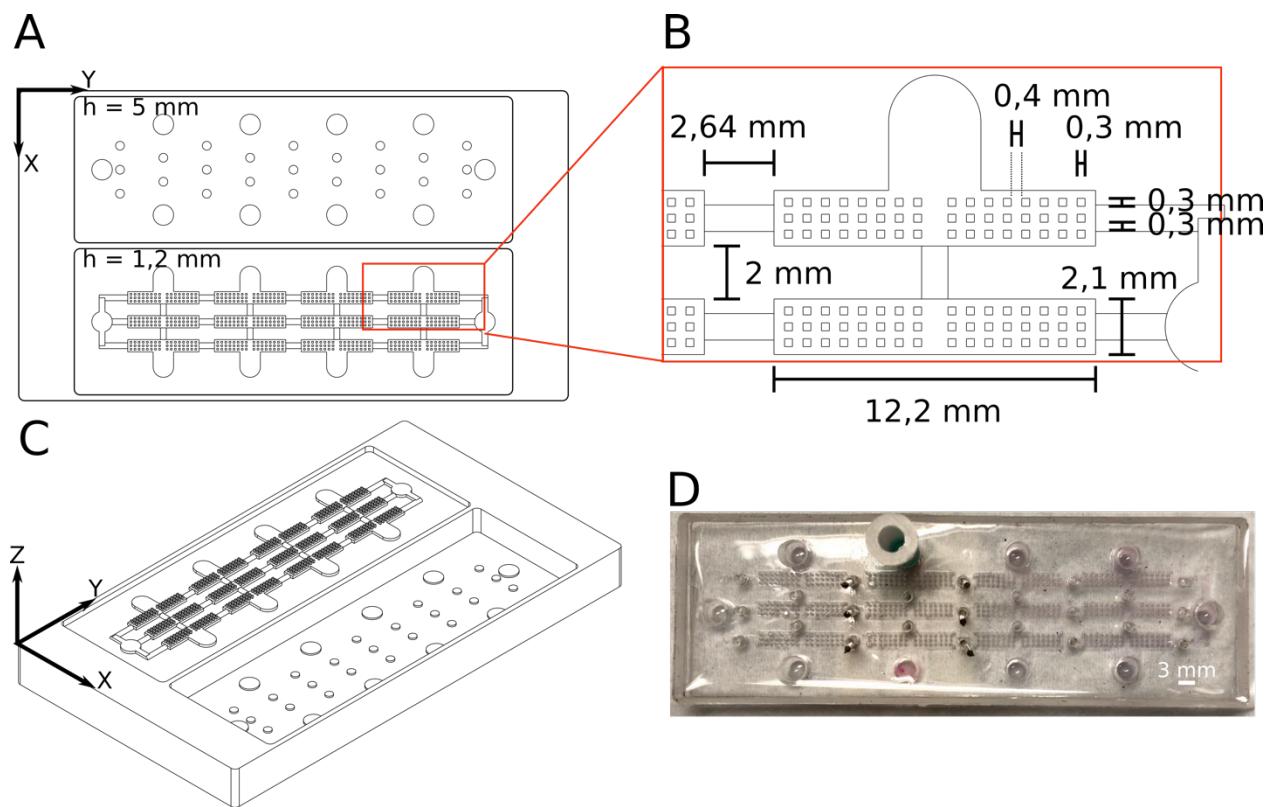


Figure 4.1 : Premier design de RCCS

(A) Moule vu de haut et (B) grossissement d'une section comportant 4 chambres de culture. (C) Vue isométrique du moule et (D) photo du dispositif assemblé.

Un second design a donc été développé pour remédier à ces problèmes, tel qu'illustre à la Figure 4.2. Tout d'abord, ce design présente des chambres de culture en forme de losanges où chacune des extrémités est liée à un canal. L'utilisation de tels losanges permet une meilleure impression du système, les pixels de l'imprimante 3D étant orientés à 45°. De plus, afin de s'assurer que le fluide pouvait remplir complètement et facilement les chambres de culture, leur taille a été diminuée à 3,3 mm × 3,3 mm, de manière à ce qu'elle soit du même ordre de grandeur que les canaux (1 mm). Cela a eu pour effet de diminuer le nombre de puits par chambre à 25,

diminuant de moitié l'échantillonnage par condition de culture, mais conservant une quantité statistiquement suffisante afin d'effectuer des tests. De plus, la taille totale du dispositif est celle maximale permise par l'imprimante ($51 \text{ mm} \times 89 \text{ mm}$), de manière à laisser une plus grande distance entre les chambres de culture (8 mm en x et 10 mm en y), afin de mieux correspondre à la distance requise pour faire des tests en utilisant la RT. Cela permet d'ajouter un canal vertical supplémentaire, faisant passer le nombre de chambres de culture de 12 à 15, et de valves supplémentaires au niveau des entrées et sorties verticales, pour faciliter le routage des fluides.

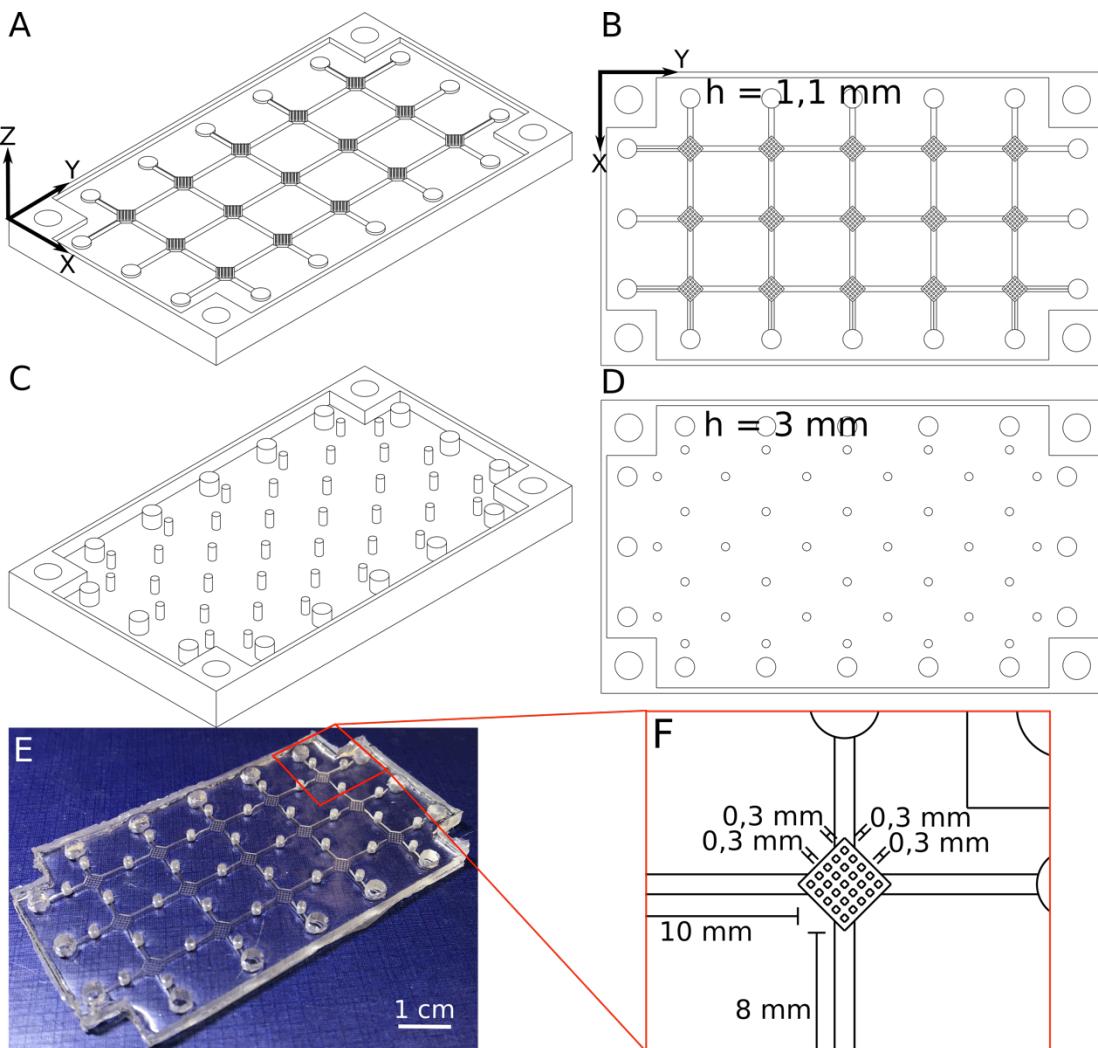


Figure 4.2 : Deuxième design de RCCS

(A) Moule de l'étage contenant les canaux et les puits en vue isométrique et (B) vu de haut. (C) Moule de l'étage contenant les entrées, les sorties et les ouvertures pour les valves en vue isométrique et (D) de haut. (E) Photo du dispositif assemblé et (F) mesures clés vues de haut.

Finalement, afin de régler les problèmes d'uniformisation de l'épaisseur des couches, des trous sont aménagés dans chacun des coins du moule, résultant en l'obtention d'un dispositif en forme de croix. Ces trous permettent de fixer le moule sur une plaque usinée de PMMA afin de limiter la déformation de la résine lorsque chauffée (Figure 2.5).

Ce second design a été testé expérimentalement avec d'excellents résultats. Par contre, plusieurs problèmes ont été rencontrés lors de l'assemblage du système. Tout d'abord, le fait que le dispositif soit en forme de croix augmente le nombre de surfaces à décoller du moule, compliquant grandement le processus de démoulage. Ensuite, le dispositif étant plus grand, l'alignement des différentes ouvertures de valves avec les canaux est particulièrement complexe, résultant en de nombreuses fuites au niveau du dispositif, seul un dispositif sur cinq fonctionnant correctement. Pour remédier à la situation, un troisième et dernier design a été développé, tel qu'illustré à la Figure 4.3.

Premièrement, la taille de ce dispositif a été diminuée à celle d'une plaque de verre de 50 mm×75 mm (2 po × 3 po), ce qui a pour effet de changer la forme générale du dispositif en celle d'un rectangle, plus facile à démouler. Toutefois, ce changement de taille entraîne la réduction du nombre de canaux verticaux, les faisant passer de cinq à quatre, causant ainsi la réduction du nombre de chambres de culture à 12, soit autant que sur le premier design. Les ouvertures pour les valves ont été modifiées de manière à être de forme ovaloïde et orientées perpendiculairement aux canaux (Figure 4.3 F), facilitant grandement le processus d'alignement.

4.1.1.1 Analyse physique du dispositif

Le temps de remplissage et le nombre de Reynolds (Re) de cette troisième version ont été analysés afin de s'assurer que le dispositif puisse être utilisé de manière réaliste lors des expériences de routage. Le temps de remplissage représente le temps requis pour remplir le dispositif d'une nouvelle solution, tel que ce qui est présenté lors des expériences de routage à la section 4.3. Pour sa part, le nombre de Reynolds est un nombre adimensionnel dérivé de l'équation de Navier-Stokes qui est fréquemment utilisé en physique afin de décrire le comportement d'un fluide dans un système. Il correspond à

$$Re = \frac{\rho v_0 L_0}{\eta} \quad (4.1)$$

où ρ correspond à la masse volumique du fluide, v_0 à la vitesse caractéristique des fluides (qui est souvent considérée comme étant la vitesse moyenne du fluide), L_0 à la longueur caractéristique du système (souvent considérée comme étant le rayon hydraulique du dispositif) et η la viscosité du fluide.

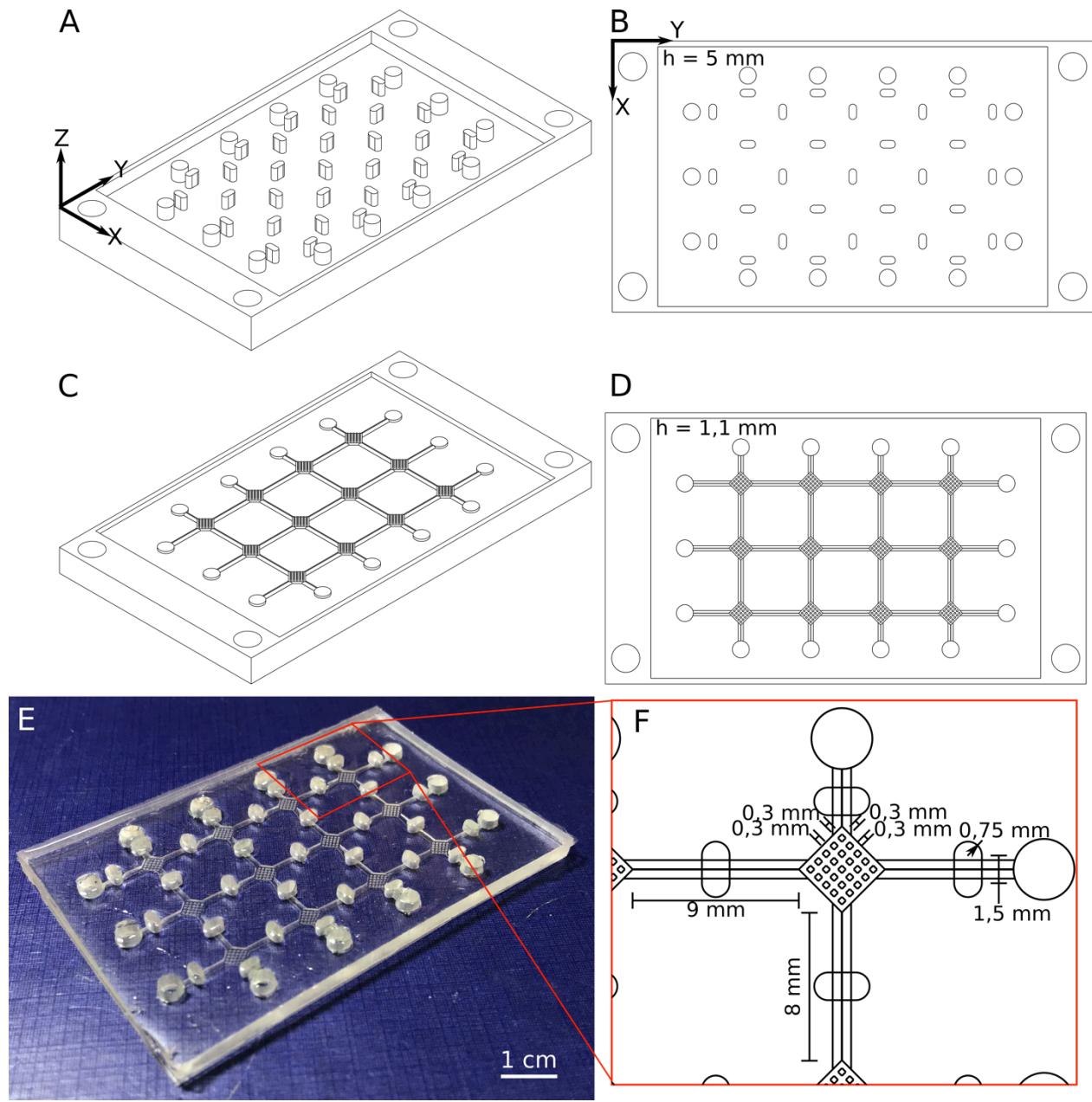


Figure 4.3 : Troisième design de RCCS

(A) Vue isométrique et (B) de haut du moule de l'étage contenant les entrées, les sorties et les ouvertures pour les valves. (C) Vue isométrique et (D) de haut du moule de l'étage contenant canaux et les chambres de culture. (E) Photo du dispositif assemblé (F) avec la taille des éléments clés.

Re représente le rapport entre les forces inertielles et les forces visqueuses dans un système, en plus de la turbulence du fluide dans le système. Ainsi, si Re est beaucoup plus petit que 1, ce sont les forces visqueuses qui dominent et on parle alors d'un écoulement de Stokes; si Re est beaucoup plus grand que 1, ce sont alors les forces inertielles qui dominent. Toutefois, si Re est beaucoup plus grand que 2000, on parle alors d'écoulement turbulent. Comme il est important de maintenir un certain contrôle sur l'écoulement dans le système, il est important de maintenir un Re plus faible que 1000 afin d'éviter cette turbulence. Comme Re dépend de la vitesse du fluide à l'intérieur du système, il est d'abord nécessaire de trouver celle-ci, ce qui permet aussi de déterminer le temps de remplissage du système. Cette vitesse peut être représentée comme

$$v_0 = \frac{Q}{A} \quad (4.2)$$

où le débit

$$Q = \frac{\Delta p}{R_{hyd}} \quad (4.3)$$

La pression Δp utilisée correspond à 102 Pa, soit la pression exercée par une colonne de un centimètre de milieu de culture ($\rho = 1007 \text{ kg/m}^3$ [46]). Pour trouver la résistance hydraulique (R_{hyd}) du dispositif, l'apport des chambres de culture a été négligé en raison de leur grande aire de coupe et de leur faible longueur par rapport aux canaux. Ainsi, pour un canal semi-cylindrique,

$$R_{hyd} = \frac{8\eta L}{R_H^2 * A} = \frac{8\eta L}{\left(\frac{2A}{P}\right)^2 * A} = \frac{16\eta L(2 + \pi)^2}{\pi^3 r^4} \quad (4.4)$$

où η correspond à la viscosité du fluide (0,96 mPa*s pour le milieu de culture [46]), L correspond à la longueur du canal et r à son rayon. De plus, afin de mieux correspondre aux expériences de routage, trois longueurs L_c , L_v et L_h seront utilisées, correspondant respectivement à la distance parcourue par le fluide lors du remplissage du dispositif au complet, d'un canal vertical ou d'un canal horizontal. Le Tableau 4.1 représente l'ensemble des résultats obtenus pour ces trois configurations.

Tout d'abord, ces résultats permettent d'observer que, dans tous les cas, Re est beaucoup plus grand que 1, mais inférieur à 100, ce qui signifie que l'écoulement des fluides dans le dispositif devrait être contrôlé par les forces inertielles, tout en restant laminaire. De plus, le temps de remplissage de chacune des configurations est de quelques secondes seulement, ce qui

est plus qu'acceptable. Ces données permettent de conclure que la troisième version du dispositif devrait convenir aux besoins de ce projet.

Tableau 4.1 : Données théoriques de l'analyse de l'expérience de routage

Propriété	Remplissage complet	Remplissage vertical	Remplissage horizontal
Longueur (mm)	105	22	41
R_{hyd} (GPa*s/m ³)	22,00	4,61	8,59
Débit (μ L/s)	4,5	21,4	11,5
Temps de remplissage (s)	9,18	0,43	1,40
Re	7,3	35,0	18,8

*Données pour du milieu de culture de type DMEM ($\eta = 0,96 \text{ mPa*s}$ et $\rho = 1007 \text{ kg/m}^3$)

4.1.2 Autres composantes

Dans le but d'opérer le système, il a aussi été nécessaire de développer les tiges métalliques, ainsi que le système d'aimants utilisés. Lors de toutes les expériences, les tiges métalliques avec une extrémité en PDMSm furent utilisées, parce qu'elles avaient moins tendance à briser la membrane des valves que les tiges régulières, comme rapporté dans la Section 3.3.3.4. En ce qui concerne le système d'aimants utilisé, quelques tentatives furent réalisées, dans le but de l'optimiser. Tout d'abord, la formation d'un réseau de Halbach, soit un agencement d'aimants permettant de concentrer le flux magnétique d'un seul côté fut exploré [47]. Son fonctionnement repose sur une juxtaposition d'aimants dont la polarité de chaque aimant est déphasée de 90° par rapport à ceux qui lui sont adjacents (Figure 4.4) et permet de maximiser le flux magnétique au-dessus du réseau, tout en maintenant un flux minimal en dessous. L'avantage de cette méthode est que, comme le dessous du réseau génère une faible force magnétique, moins de précautions sont requises lors de sa manipulation, notamment lors du séjour dans l'incubateur. Cette méthode a toutefois comme inconvénient principal le fait d'être

instable à cause des changements de polarité à 90° , faisant en sorte que l'utilisation d'un guide pour maintenir les aimants en place est nécessaire. Ce guide augmentant la distance entre les aimants et les barreaux métalliques, la force des aimants en est diminuée, affectant la résistance des valves. Ce système s'avère aussi peu flexible à cause de contraintes physiques, l'emplacement des aimants étant dicté par leur taille, ce qui l'a mis en désuétude lorsque les dimensions changèrent de $25\text{ mm} \times 75\text{ mm}$ à $50\text{ mm} \times 75\text{ mm}$, les aimants utilisés ayant une taille de $24,7\text{ mm} \times 3,18\text{ mm} \times 3,18\text{ mm}$. Un autre inconvénient observé fut l'inhomogénéité du champ magnétique généré qui était plus fort au centre de l'aimant que sur les côtés, affectant la résistance des canaux les plus hauts et les plus bas.

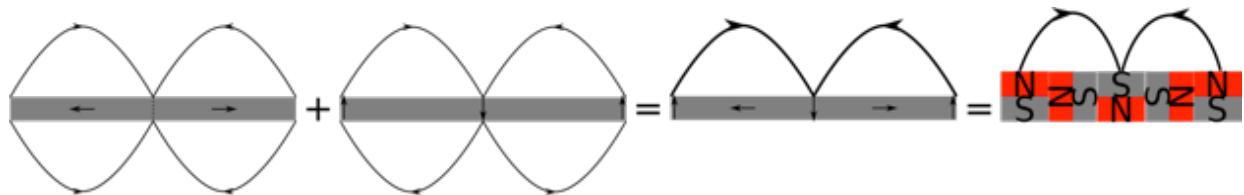


Figure 4.4 : Réseau de Halbach

En alternant la polarité des aimants de 90° en sens anti-horaire à chaque aimant, il est possible d'augmenter le flux magnétique au-dessus du réseau et d'annuler celui sous le réseau.

Par la suite, un second système d'aimants, plus simple que le premier, a été élaboré. Ce système repose sur l'utilisation d'une plaque de PMMA usinée par découpe laser dans laquelle des aimants sont insérés. Ce système a comme avantage d'être plus flexible que le premier, l'emplacement de chaque aimant pouvant être choisi par l'utilisateur, permettant aussi de les centrer avec l'emplacement des valves pour augmenter la force magnétique. Lors des premiers tests, les aimants étaient insérés de manière à tous être orientés dans le même sens (pôle Nord vers le haut), ce qui rendait le système sensible aux perturbations. Dans le but de diminuer cette sensibilité, les aimants ont été insérés de manière à ce qu'il y ait une alternance entre les polarités, permettant d'augmenter leur stabilité, en plus d'augmenter la force magnétique générée (Figure 4.5 A).

Un autre avantage de cette solution est que l'utilisation d'une plaque de PMMA (transparente) permet d'imager le système avec un microscope inversé, ce qui était impossible avec l'autre système d'aimants. Dans le but de maximiser cet effet, une première plaque, comportant des ouvertures sous les chambres de culture a été fabriquée (Figure 4.5 B), mais les ouvertures fragilisaient trop la structure, faisant en sorte que la plaque se brisait facilement. Une

plaques ne contenant des ouvertures qu'aux emplacements des aimants a donc été utilisée, comme illustrée à la Figure 4.5 C.

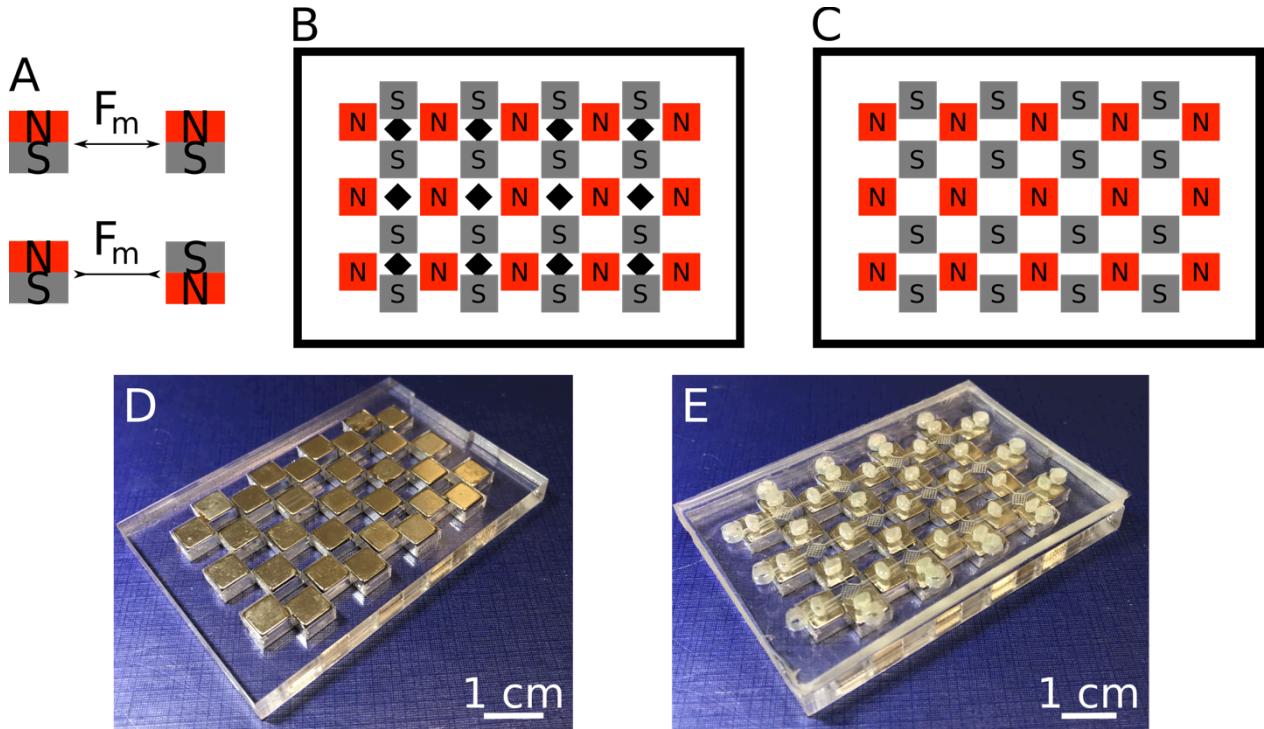


Figure 4.5 : Différents types de plaques d'aimants utilisées

(A) En alternant la polarité des aimants, ils ont tendance à s'attirer plutôt que de se repousser, augmentant la stabilité du système. (B) Premier design de plaque d'aimants comportant des ouvertures (losanges noirs) pour l'imagerie des chambres de culture. (C) Second design de plaque d'aimant. (D) Photo de la plaque d'aimants seule et (E) avec la 3^e version du dispositif.

4.2 Préparation

Les RCCS ont servi à deux types d'expériences : une première évaluant leur capacité à diriger une solution aqueuse selon une configuration précise choisie par l'utilisateur et une seconde évaluant la formation de sphéroïdes à l'intérieur des chambres de culture. Dans les deux cas, les systèmes ont été préparés en suivant le même protocole, afin de s'assurer que ce qui était testé répliquait des conditions réalistes.

Tout d'abord, avant la préparation des systèmes, une boîte servant à la culture est stérilisée à l'autoclave et un essuie-tout humide y est inséré afin de maintenir un taux d'humidité élevé à l'intérieur. Lors de leurs séjours dans l'incubateur, les dispositifs étaient toujours déposés à

l'intérieur de cette boîte afin de limiter l'évaporation du milieu de culture. Par la suite, la préparation des systèmes était toujours effectuée de la manière suivante :

- Insertion de connecteurs en plastique dans chacun des ports d'entrée/sortie;
- Stérilisation des systèmes à l'éthanol 70% et en les incubant à 37°C pour une période de 10 min;
- Remplissage du système à l'éthanol 100%;
- Retrait de l'éthanol 100% avec un tube d'aspiration;
- Répéter les étapes 2 et 3 jusqu'à ce que le système soit exempt de bulles d'air;
- Remplissage du système avec une solution de PluronicTM à 10 mg/mL;
- Incubation du système à 37°C pendant 2h;
- Retrait de la solution de PluronicTM avec un tube d'aspiration;
- Rinçage du système avec du PBS;
- Remplacement manuel du PBS par du milieu cellulaire (DMEM/F12) 200µL à la fois; pour ce faire, on injecte le milieu de culture par l'ouverture choisie comme entrée et on retire le PBS par l'ouverture choisie comme sortie en utilisant une micropipette;
- Exposition du système à 8 Gy de RT.

Suite à ces traitements, les dispositifs subissaient d'autres traitements en fonction de l'expérience réalisée, soit une incubation de 7 jours à 37°C pour l'expérience de routage et l'insertion d'une suspension cellulaire pour ce qui est de la culture cellulaire. Lors des expériences de culture cellulaire, le milieu de culture était changé à chaque 24 h afin d'assurer un apport suffisant en nutriments [21] et de prévenir la formation de bulles d'air dans le dispositif.

4.3 Routage

Les dispositifs ont d'abord été utilisés pour évaluer leur capacité de routage, soit leur aptitude à diriger les fluides selon la direction choisie par l'utilisateur. Pour ce faire, après avoir subi les traitements indiqués en 4.2, les dispositifs étaient remplis d'éthanol 70% afin de retirer toute trace de milieu cellulaire et de bulles d'air. Par la suite, ils étaient déposés sur la plaque d'aimants correspondant à la version du système utilisé et les connecteurs en plastique des sorties étaient retirés. Cette décision a été prise car elle permet d'introduire une variation de pression entre les ports d'entrée et de sortie en fonction de la hauteur de la colonne de liquide présente dans les connecteurs, augmentant la vitesse du fluide dans le dispositif. Ensuite, les valves reliées aux différents ports d'entrée étaient fermées et les ports étaient remplis de solutions d'eau déionisée et de colorant alimentaire, afin de pouvoir étudier le comportement de la solution une

fois dans le système (convection et diffusion). Le Tableau 4.2 résume les principaux problèmes rencontrés lors de ces expériences.

Pour chaque version du système, trois configurations de valves furent testées : l'une permettant le remplissage complet du système à partir d'un port d'entrée et un port de sortie, l'une permettant de remplissage d'une ligne verticale et l'une permettant le remplissage d'une ligne horizontale du système. Dans tous les cas, les tiges métalliques étaient ajoutées de manière à fermer les valves des canaux désirés, avant que celle ou celles fermant le ou les ports d'entrée ne soient retirées. La Figure 4.6 illustre les résultats obtenus quelques secondes après l'ouverture de la valve du ou des ports d'entrée pour les deux premières versions du dispositif. En ce qui concerne la première version du dispositif (Figure 4.6 A), on y voit le problème mentionné au point 4.1.1, à savoir que lors du remplissage du système induit par l'ouverture des canaux verticaux, une large portion du liquide contenu dans la chambre de culture n'est pas remplacée par la nouvelle solution. De plus, comme le champ magnétique et la distance entre les aimants et les tiges métalliques étaient inhomogènes, les valves éprouvaient de la difficulté à router efficacement les liquides.

Tableau 4.2 : Problèmes et solutions des différentes versions du dispositif lors des expériences de routage

Version du dispositif	Problème(s) rencontré(s)	Solution(s) envisagée(s)
1.0	<ul style="list-style-type: none"> • Difficulté du fluide à remplir la totalité des chambres de culture lors du remplissage vertical • Inhomogénéité du champ magnétique 	<ul style="list-style-type: none"> • Chambres de culture en forme de losanges orientés à 45° • Utilisation d'aimants carrés de plus petite taille centrés avec les valves
2.0	<ul style="list-style-type: none"> • Difficulté à démouler et à aligner les différents étages du dispositif causant plusieurs fuites au niveau des valves 	<ul style="list-style-type: none"> • Changement de la forme générale du dispositif et de celle des ouvertures des valves
3.0	<ul style="list-style-type: none"> • Alignement sommaire des tiges ferromagnétiques nécessaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Aucune pour le moment

Dans les images concernant la deuxième version du dispositif (Figure 4.6 B), il est possible de voir que certaines valves ont des fuites, ce qui est en grande partie dû au problème d'alignement des valves du dispositif lors de l'assemblage. Il est vrai que ce problème aurait théoriquement pu être évité en trouvant une méthode d'alignement plus précise, mais nous avons

préféré remédier à la situation en augmentant la robustesse de notre design, ce qui a été fait en changeant la forme des ouvertures des valves.

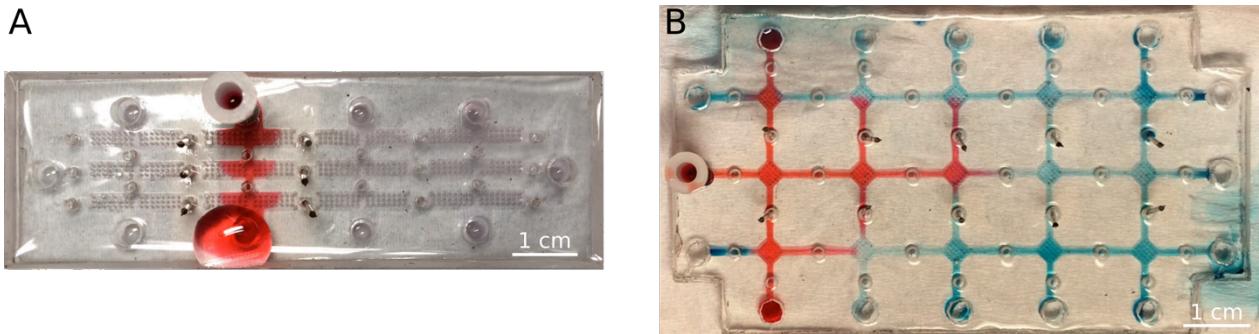


Figure 4.6 : Expériences de routage pour les deux premiers designs

(A) Expérience de routage pour le changement vertical du fluide (solution rouge) dans le premier design. Le fluide a de la difficulté à atteindre l'extrémité des chambres de culture (section incolore avant les tiges des deux côtés du colorant rouge). (B) Expérience de routage pour le changement horizontal du fluide (solution rouge) dans le second design. La majorité des valves ont des fuites, ce qui explique la diffusion de la solution rouge dans les chambres des lignes supérieure et inférieure.

En ce qui concerne la version finale du dispositif, la Figure 4.7 illustre des images provenant d'une seule expérience à différents moments. On note que le fluide emprunte le chemin correspondant à la configuration sélectionnée, sans aucune fuite, ni diffusion à travers les valves. Les temps de remplissage de chacune des configurations testée ont été respectivement de une minute, 10 s et 20 s pour le remplissage complet, vertical et horizontal du système. Bien que ces temps soient de cinq à vingt fois plus élevés que ceux présentés dans le Tableau 4.1, ils peuvent s'expliquer par le fait que la différence de pression diminue au fur et à mesure que le liquide remplit les canaux. Ainsi, il suffirait d'injecter du fluide de manière à maintenir constant le niveau de la colonne de liquide pour obtenir des résultats plus près de la théorie. Les résultats obtenus étant de quelques minutes seulement, ils restent acceptables dans un contexte de culture cellulaire. Toutefois, compte tenu de la forme des ouvertures pour les valves, qui sont beaucoup plus grandes que les canaux et les tiges ferromagnétiques, il est nécessaire de réaliser un alignement sommaire des tiges lors de leur insertion dans le système, de manière à s'assurer qu'elles soient centrées avec le canal. En effet, si la tige n'est pas alignée avec le milieu du canal ou ne se trouve pas directement au-dessus de celui-ci, les valves ont de fortes chances de présenter des fuites. Malgré cela, il ne fait aucun doute que le dispositif, tel que présenté, permet d'effectuer un routage efficace de fluides, ce qui devrait être un atout dans l'exploration des TC.

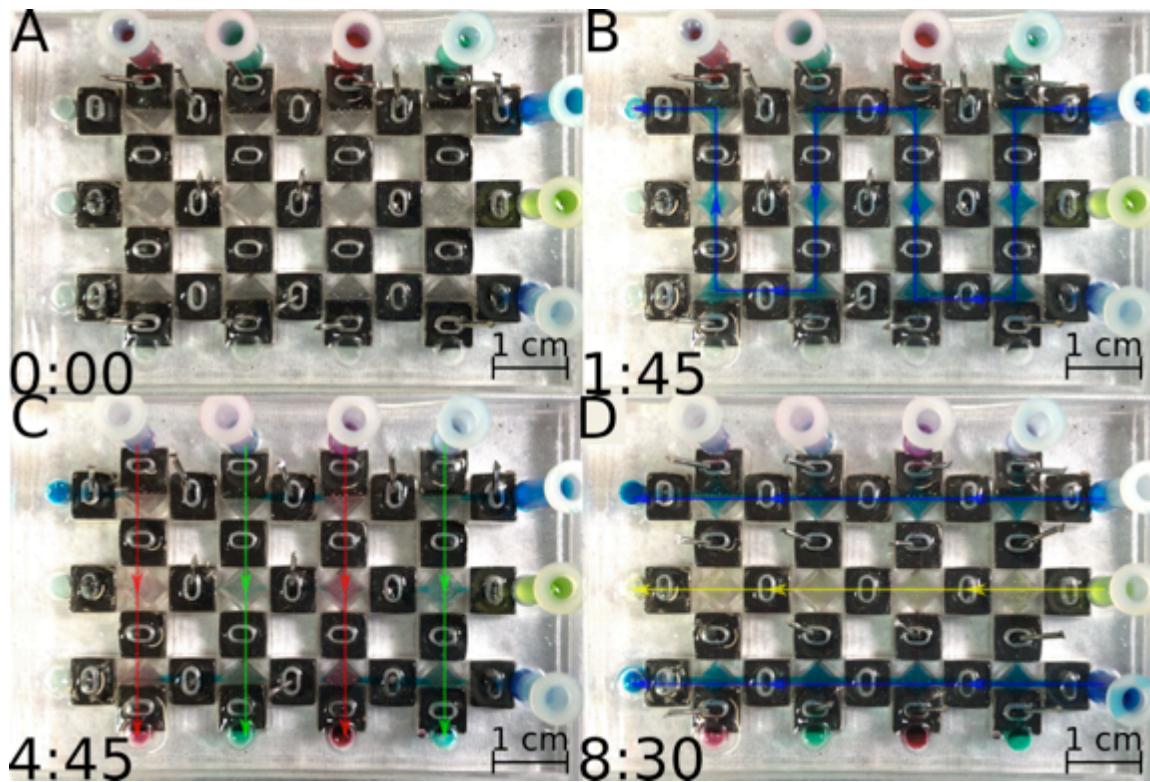


Figure 4.7 : Expérience de routage du 3^e design

(A) Dispositif rempli d'éthanol (incolore). (B) Remplissage du dispositif en entier à partir d'une entrée et d'une sortie en suivant le chemin indiqué par la ligne bleue. Le remplissage s'est effectué en une minute,, mais aurait pu être plus rapide si la colonne d'eau avait été maintenue à un centimètre en injectant constamment du milieu de culture. Remplissage des canaux verticaux (C) et horizontaux (D) en suivant les chemins indiqués par les lignes. Il a fallu respectivement 10 s et 20 s pour remplir ces canaux. Chaque changement de configuration de valves a été effectué en environ 30 s.

4.4 Culture cellulaire

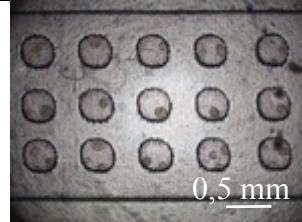
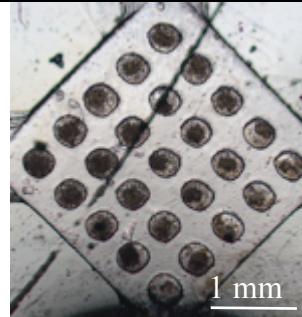
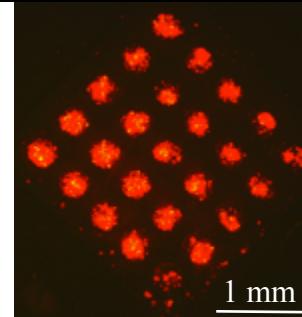
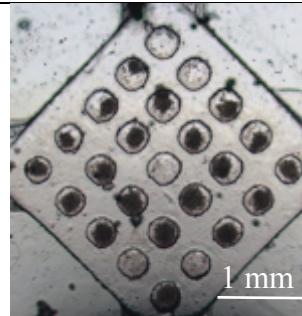
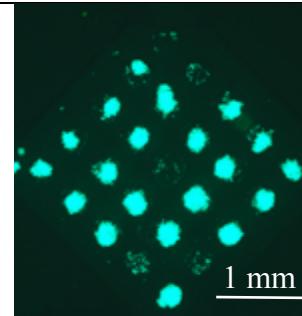
Comme pour les expériences sur le routage, les dispositifs évalués pour la culture cellulaire ont d'abord subi les traitements trouvés à la Section 4.2. Par la suite, des suspensions cellulaires étaient injectées dans le système via les ports d'entrée, 200 µL à la fois, en prenant soin de retirer la même quantité de milieu cellulaire du port de sortie. La nature et la densité des suspensions cellulaires injectées dans chacune des versions du dispositif ainsi que les images correspondantes sont indiquées dans le Tableau 4.3.

Les cellules de la lignée STS117 ont été utilisées en premier à cause de la facilité avec laquelle elles forment des sphéroïdes et de leur pertinence dans un contexte de recherche de traitement combinatoires utilisant la RT et la CT. Cette lignée est dérivée des sarcomes de tissus mous, une variété de cancers reconnus pour leur sensibilité aux traitements de RT et pour

lesquels les traitements les plus fréquents reposent sur leur combinaison avec d'autres médicaments [5,48,49]. Par contre, dans le but d'évaluer la capacité du système à cultiver différentes populations cellulaires simultanément, des cellules provenant des lignées OV90 et OV1946 ont aussi été utilisées. Ces deux populations de cellules sont reconnues pour former aisément des sphéroïdes [50,51] et ont été génétiquement modifiées afin d'exprimer respectivement les fluorophores mCardinal (rouge) et eGFP (vert), permettant de les différencier dans le système lorsqu'imagé en fluorescence. Après l'injection des cellules dans le système, les dispositifs étaient mis dans un incubateur à 37°C pour une période allant de 24h à 7 jours, en fonction des expériences réalisées. Au cours de cette période, le milieu de culture cellulaire était remplacé à chaque 24h, afin d'éviter son évaporation du système, tel que constaté lors des expériences sur la résistance des valves (Section 3.3.3.4). Les systèmes étaient imagés à chaque 24h, avant le changement de milieu, afin d'évaluer la formation de sphéroïdes. Lors de l'imagerie des systèmes, il était nécessaire de les retirer de la plaque d'aimants, compte tenu de la distance de travail du microscope utilisé, ce qui avait pour effet d'ouvrir les valves.

Comme on peut le voir, chaque version a été en mesure de produire des sphéroïdes d'assez bonne grosseur. Cependant, la vitesse de formation, la densité des sphéroïdes et autres propriétés similaires varient grandement d'une lignée cellulaire à l'autre; certaines formant des sphéroïdes compacts en quelques heures, alors que d'autres n'en forment jamais. Sur les images, il est possible de voir que ce ne sont pas tous les puits qui contiennent des sphéroïdes. Cela peut s'expliquer par le fait qu'il est plus facile d'éjecter les sphéroïdes de plus grande taille, la taille optimale pour le piégeage de sphéroïdes étant la moitié de celle du puits qui le contient. Les sphéroïdes contenus dans les puits en remplissant visiblement plus de la moitié, il est fort possible que ceux qui étaient dans les puits vides les aient quittés suite à l'ouverture des valves et au changement de salle pour l'imagerie des dispositifs. Le moyen le plus simple de régler ce problème serait de diminuer la densité de la suspension cellulaire, diminuant la taille des sphéroïdes et d'utiliser un système d'imagerie dont la distance de travail soit adaptée au dispositif, permettant l'imagerie du dispositif lorsque les valves sont fermées.

Tableau 4.3 : Résultats culture cellulaire

Version du dispositif/ Lignée cellulaire	Densité de la suspension cellulaire	Image en champ clair	Image en fluorescence
Premier design/ STS117	$0,3 \times 10^6$ cellules/mL		N/A
Troisième design/ OV90 exprimant mCardinal	5×10^6 cellules/mL		
Troisième design/ OV1946 exprimant eGFP	$2,5 \times 10^6$ cellules/mL		

CHAPITRE 5 SYNTHÈSE

Ce chapitre analysera l'ensemble des résultats obtenus au niveau des techniques de fabrication, des valves et du dispositif de culture cellulaire (RCCS) final employés. Le tout servira à justifier le potentiel de la technologie développée ainsi que les applications possibles pour le futur. Finalement, des améliorations possibles pour le futur du projet seront suggérées.

5.1 Retour sur les principaux résultats et les objectifs

5.1.1 Fabrication

Au cours du présent travail, des moules pour des systèmes microfluidiques en PDMS ont été réalisés à partir de techniques d'impression 3D. Le PDMS a été choisi comme matériau de fabrication en raison de sa flexibilité, sa transparence, sa perméabilité à l'air et sa biocompatibilité. L'utilisation de l'impression 3D constitue une grande amélioration par rapport à ce qui est traditionnellement fait pour la fabrication de dispositifs microfluidiques. Pour réaliser de tels moules en employant les techniques de micro-fabrication standard, il aurait fallu réaliser des masques dont le cout est de plusieurs milliers de dollars et travailler en salle blanche afin de réaliser les moules. Le tout, en plus d'être dispendieux, aurait pris plusieurs jours, voire semaines, pour l'obtention d'un seul moule. De plus, comme la formation de sphéroïdes requiert l'utilisation de puits de plusieurs centaines de microns de hauteur séparés par quelques centaines de microns, la fabrication des moules par micro-usinage aurait pu s'avérer complexe. L'impression 3D avait comme avantages le fait d'avoir une courbe d'apprentissage très rapide, contrairement aux deux autres techniques, et de permettre la réalisation d'un moule prêt à être utilisé en une ou deux heures. De plus, les imprimantes utilisées fonctionnant selon le processus de stéréolithographie inversée, le temps d'impression était seulement affecté par la hauteur du moule réalisé et non la complexité des structures réalisées. Ce dernier élément distingue l'impression 3D du micro-usinage où la complexité des structures à réaliser affecte grandement le temps requis pour fabriquer un moule.

Cependant, l'impression 3D n'est pas une technique sans inconvénient. Tout d'abord, il semble y avoir une interaction entre la résine utilisée pour l'impression et le PDMS, prévenant le durcissement complet de ce dernier lors du moulage. Pour remédier à la situation, plusieurs

solutions ont été expérimentées, celle fonctionnant le mieux étant un recouvrement de la surface du moule par une encre noire à base d'eau avec un aérographe. Ce recouvrement permet d'éviter tout contact entre la résine et le PDMS, permettant son durcissement complet, en plus de faciliter le processus de démolage. Un autre inconvénient de l'impression 3D est la fragilité des moules réalisés, comparativement à ceux obtenus par micro-fabrication ou micro-usinage. En effet, alors qu'un moule micro-usiné peut être utilisé plusieurs centaines de fois sans s'abîmer, les moules réalisés par impression 3D ont plutôt une durée de vie de l'ordre de quelque dizaines de moulages. De plus, comme les moules sont réalisés en résine, ils résistent moins bien à la chaleur, limitant les températures pouvant être utilisées pour le durcissement du PDMS à 80°C. Les températures élevées ont aussi comme effet de faire ramollir les moules et de les faire se replier sur eux-mêmes. Pour remédier à la situation, nous avons fixé les moules les plus larges à des plaques de PMMA afin de limiter les déformations subies.

Malgré ces nombreux inconvénients, l'impression 3D reste un moyen rapide et efficace d'effectuer des moules. Pour ces raisons, elle est particulièrement utile dans un contexte de prototypage, comme ce fut le cas dans ce projet. En effet, grâce au faible temps requis pour fabriquer un moule, l'utilisation de l'impression 3D permettait de concevoir, de fabriquer et de tester un moule, ainsi que le dispositif correspondant, en moins d'une journée, tout en permettant l'obtention d'éléments de quelques centaines de microns. Cela nous permet d'affirmer que le premier objectif de ce projet, «Développer des techniques de fabrication permettant le prototypage rapide de dispositifs» a été atteint. Cependant, dans un cadre de production à grande échelle, il serait préférable de réaliser des moules en PMMA par micro-usinage à cause de la durabilité du produit fini et de la capacité du PDMS d'y durcir naturellement.

5.1.2 Résistance des valves

Au cours de ce projet, deux types de valves ont été explorés, des valves manuelles pneumatiques à pression négative et des valves manuelles magnétiques. Dans les deux cas, le choix d'utiliser des valves manuelles a été réalisé, car elles ne requièrent pas de source d'énergie externe, ce qui aurait pu compromettre leur compatibilité à l'incubation à 37°C. De plus, les valves manuelles sont généralement moins complexes à opérer que les valves actives, ce qui devrait en faciliter l'adoption par les utilisateurs. Les valves manuelles pneumatiques ont été explorées en premier à cause de leur capacité à être fermées par défaut. Par contre, lors de leur

fabrication, plusieurs problèmes liés à l'assemblage ont été rencontrés et leur opération aurait demandé une quantité importante de sources de pressions négatives et de tuyauterie, rendant le tout encombrant et pouvant compromettre son adoption. Pour toutes ces raisons, l'utilisation de ce type de valves dans le cadre du présent projet a été abandonnée.

Par la suite, les valves manuelles magnétiques ont été étudiées. Ce type de valves permet l'adressage individuel des valves, en plus d'être compact, simple à utiliser et de posséder une résistance élevée à la pression. Elles sont ouvertes par défaut et peuvent être fermées manuellement en mettant un aimant permanent sous le canal et une tige ferromagnétique sur le canal. Quatre formes différentes de canaux ont été testées, la plus efficace étant un canal avec une section cylindrique de 0,5 mm de rayon. Ainsi, le second objectif du projet, «Développer un système de valves microfluidiques simple à utiliser et pouvant séparer des chambres de culture de manière réversible», a été rempli. Par la suite, la résistance des valves à la pression après différents traitements répandus en culture cellulaire a été explorée. Le but visé était de s'assurer que les valves avaient idéalement une résistance à la pression d'au moins 10 kPa (résistance minimale désirée), soit l'équivalent d'une colonne d'eau de 1 m, de manière à assurer l'étanchéité des valves lors de manipulations comme l'éjection de bulles d'air des canaux ou le déplacement du dispositif.

Les résultats obtenus après une incubation de 7 jours à 37°C et une exposition à la RT de 8 Gy étaient tous supérieurs à 10 kPa, ce qui indique que les valves répondent aux objectifs fixés, prévenant la diffusion à travers celles-ci. De plus, si les valves sont maintenues fermées lors de l'incubation, elles épousent plus fidèlement la forme du canal, permettant d'augmenter la résistance à la pression de manière significative. Un autre résultat important est le fait que le retrait du recouvrement de la tige (PDMSm) augmente de manière significative la résistance des valves, mais engendre, à long terme, une augmentation des probabilités de bris de canaux, causant des fuites hors du système. Comme l'utilisation de tiges recouvertes de PDMSm permet l'obtention d'une résistance supérieure à 10 kPa, sans compromettre l'intégrité du système, leur utilisation a été maintenue pour le reste du projet. L'ensemble de ces résultats permet donc d'affirmer que le troisième objectif, «Valider la résistance des valves à la pression suite à des traitements nécessaires à la culture cellulaire et aux essais combinatoires» a été rempli.

5.1.3 Réseau de chambres de culture de sphéroïdes

Suite à l'évaluation de la résistance des valves, un dispositif a été conçu dans le but de les utiliser pour permettre la culture d'échantillons cellulaires sous forme de sphéroïdes et le routage de fluides. L'utilisation d'un tel dispositif devrait permettre de découvrir des synergies entre différents réactifs et/ou modalités de traitement. Plusieurs itérations ont été nécessaires afin d'optimiser le processus de fabrication et les propriétés de routage du dispositif. Le design final comporte 12 chambres de culture en forme de losange pouvant chacune être séparée des autres de manière réversible, tout en permettant la culture de 25 sphéroïdes par chambre. Ce dispositif remplit donc le quatrième objectif, «Concevoir un dispositif microfluidique adapté à la culture de sphéroïdes utilisant les techniques et technologies développées». Il permet aussi de rediriger des fluides (colorants alimentaires) selon différentes configurations utiles pour la culture cellulaire, remplissant le cinquième objectif «Valider les propriétés de routage du dispositif pour des solutions aqueuses». Ainsi, il est possible de remplir le dispositif à partir d'une seule entrée et une seule sortie et d'injecter des solutions différentes en utilisant les différents canaux verticaux et horizontaux. Par la suite, la formation de sphéroïdes de trois lignées cellulaires (STS117, OV90 et TOV1946) a été évaluée dans le système. Les sphéroïdes formés ont été imaginés en champ clair et en fluorescence directement sur le dispositif. Malheureusement, lors des manipulations, certains sphéroïdes ont été éjectés des puits, ce qui peut s'expliquer par leur grande taille et le fait que les valves doivent être ouvertes pour imager le système à cause de la grande distance de travail requise pour l'imager convenablement. Toutefois, l'expérience a permis de «Valider la formation de sphéroïdes dans le dispositif», soit le sixième objectif. Toutefois, aucune expérience réalisée n'a permis d'«évaluer la viabilité cellulaire et la croissance des sphéroïdes dans le dispositif», ce qui signifie que le septième et dernier objectif n'a pu être rempli dans le cadre de ce projet.

5.2 Applications futures

Comme mentionné précédemment, la viabilité cellulaire et la croissance des sphéroïdes dans le dispositif n'ont pas été formellement évaluées dans le cadre de ce projet. Ainsi, il serait important de réaliser ces expériences afin d'assurer la confiance des chercheurs envers le dispositif. Une fois ces expériences réalisées, l'utilisation du dispositif devrait permettre la réalisation d'essais de traitements combinatoires à grande échelle, tout en diminuant le temps

requis pour ce faire. Les prochaines étapes de ce projet seraient d'utiliser le dispositif pour : valider les interactions entre des médicaments qui sont connus pour en avoir afin de confirmer l'efficacité du dispositif, puis tester d'autres médicaments afin de découvrir de nouvelles interactions. La même chose pourrait être effectuée simultanément, mais en utilisant de la RT.

Une autre application possible, mais qui n'a pas été abordée dans le cadre de ce projet serait son utilisation afin d'observer les effets de voisinage. Les effets de voisinage sont décrits comme tout effet que peut avoir une population cellulaire ayant subi un traitement sur une autre population, non-traitée [52]. L'utilisation d'un dispositif permettant la séparation virtuelle et réversible des chambres de culture à tout moment au cours d'une expérience devrait permettre l'étude de ces effets, sans avoir à déplacer les cellules en cours d'expérience. Cela permettrait d'éviter le stress que pourraient vivre les cellules lors de leur déplacement, diminuant ainsi les sources d'erreurs potentielles. Une compréhension accrue des effets de voisinage et des mécanismes qui les régissent pourrait permettre de diminuer les effets secondaires d'un traitement, accroissant ainsi la qualité de vie des personnes qui les subissent.

5.3 Améliorations possibles

Bien que l'objectif principal du projet ait été atteint, certains aspects pourraient être améliorés. Le processus de fabrication des dispositifs, bien qu'adapté dans le cadre d'un projet de prototypage, n'est pas optimal pour une production à grande échelle. La première étape pour l'améliorer serait la production de moules en PMMA réalisés par micro-usinage. Comme mentionné précédemment, de tels moules ont comme avantages d'être beaucoup plus durables que ceux réalisés par impression 3D, résistent à des températures plus élevées sans altération importante de leur forme et permettent au PDMS durci d'être retiré plus facilement des moules.

Une seconde amélioration possible de la fabrication serait d'intégrer la membrane de PDMS 20:1 directement sur les moules. Cet élément ne fut pas mis en oeuvre dans le cadre de ce projet, car il aurait fixé l'épaisseur de la membrane pour chaque prototype, alors que l'approche utilisée permettait de faire varier les paramètres de fabrication de la membrane (épaisseur, temps et température de durcissement et ratio de PDMS) de manière indépendante à ceux du corps du dispositif. Toutefois, une telle approche présentait plusieurs inconvénients, notamment lors de l'assemblage du dispositif, où il n'était pas rare d'observer la formation de plis ou des ruptures

dans la membrane lors de son retrait du substrat en verre. Pour intégrer la membrane directement sur le moule, le moyen le plus simple serait de réaliser un moule ayant une distance de 115 μm entre le haut des ouvertures des valves et le haut du moule (Figure 5.1 a). Ce moule pourrait être rempli de PDMS 20:1, lui conférant une flexibilité plus élevée. Une autre approche (Figure 5.1 b) serait de remplir la moitié du moule avec du PDMS 10:1, de le laisser durcir, puis d'y insérer du PDMS 20:1. Cette approche, si réalisable, serait préférable à la première, parce qu'elle permettrait de conserver la rigidité de l'ensemble, facilitant la manipulation du dispositif et l'insertion des connecteurs d'entrée/sortie, tout en maintenant une flexibilité accrue au niveau de la membrane.

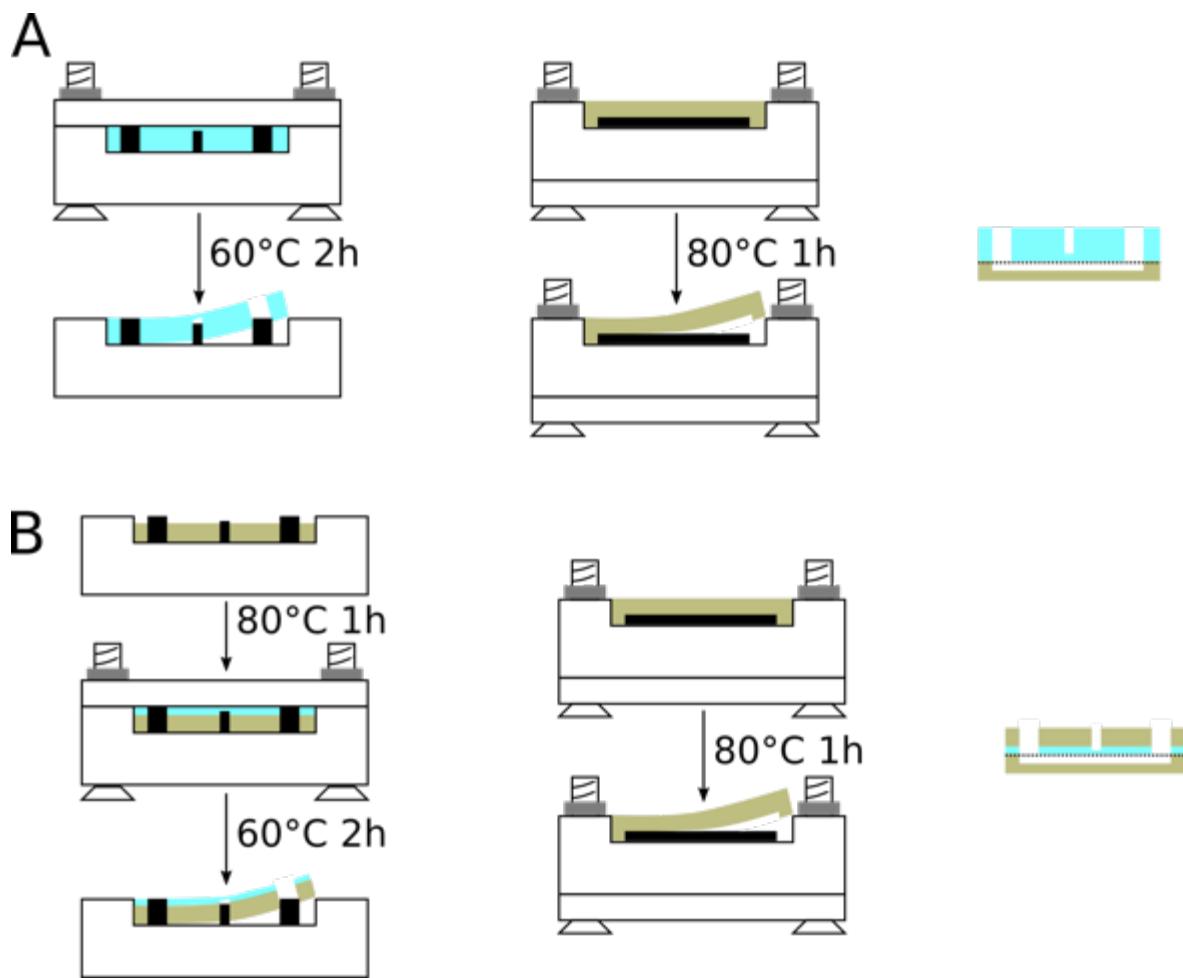


Figure 5.1 : Modes de fabrication alternatifs

(A) À partir d'un moule rempli de PDMS 20 :1 pour la formation simultanée de la membrane et de l'étage comprenant les entrées et les ouvertures pour les valves ou (B) à partir du même moule rempli successivement de PDMS 10 :1 et 20 :1.

Une troisième amélioration possible, grandement liée aux précédentes serait d'optimiser le temps de durcissement du PDMS utilisé pour la membrane. En effet, le temps utilisé dans le cadre de ce projet fut très conservateur (72 h), dans le but d'assurer la plus grande flexibilité possible au niveau de la membrane, tout en lui conférant une rigidité suffisante pour permettre son retrait du substrat de verre. Si la membrane était formée directement sur le moule, comme recommandé dans la seconde amélioration, le temps de durcissement pourrait probablement être diminué, augmentant la flexibilité de la membrane et sa résistance à la pression. De plus, le temps de durcissement de la membrane étant l'élément limitant de la fabrication du dispositif, sa diminution permettrait de diminuer le temps total nécessaire à la fabrication du dispositif, en plus d'en simplifier l'assemblage.

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

L'objectif principal de ce projet était de concevoir un dispositif microfluidique permettant la culture de sphéroïdes dans des chambres de culture cellulaire pouvant être séparées virtuellement et de manière réversible. Le but recherché était de permettre le routage de fluides afin d'étudier des synergies entre différents médicaments et modalités de traitement sur des cultures cellulaires, le tout pour augmenter l'efficacité et/ou diminuer les effets secondaires de traitements dans la recherche sur le cancer. Pour ce faire, il a été nécessaire de développer des techniques de fabrication et de réaliser des valves, puis de concevoir un dispositif compatible aux techniques utilisées en culture cellulaire en utilisant ces technologies. Le design retenu est celui d'un dispositif entièrement composé de PDMS dont les chambres de culture sont en forme de losange et comportent chacune 25 puits permettant la formation et la croissance de sphéroïdes. Le dispositif compte 12 de ces chambres (4×3) et chacune d'elles est entourée de valves permettant le routage du fluide autour ou à l'intérieur de la chambre, selon les besoins. Les valves utilisées sont des valves manuelles magnétiques, car elles sont compactes, facile à opérer et compatibles à l'incubation à 37°C. La résistance de ces valves a été évaluée et est supérieure à 10 kPa, même après une incubation de 7 jours et une exposition à une dose de RT de 8 Gy. Finalement, le dispositif a permis la culture de sphéroïdes provenant de trois lignées cellulaires différentes, ainsi que leur visionnement au microscope en champ clair et en fluorescence.

Comme il a été impossible d'étudier des synergies entre différentes modalités de traitements au cours de ce projet, il reste à évaluer la croissance de sphéroïdes dans le dispositif et en valider l'efficacité en testant des médicaments dont l'interaction a déjà été prouvée, avant de pouvoir affirmer que le but visé a été atteint. Par la suite, si les résultats s'avèrent concluants, différents médicaments pourraient être combinés afin de découvrir de nouvelles interactions entre eux. Pour ce faire, le processus de fabrication du dispositif devrait être adapté afin de permettre sa production à grande échelle. Plusieurs pistes de solutions devraient permettre cette production à moindre cout, permettant l'utilisation du dispositif pour découvrir de nouveaux traitements combinatoires dans le domaine de l'oncologie, augmentant ainsi les chances de survie et la qualité de vie de la population en général.

BIBLIOGRAPHIE

1. Matthews, H.; Hanison, J.; Nirmalan, N. “Omics”-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, Challenges and Future Perspectives. *Proteomes* **2016**, *4*, 28, doi:10.3390/proteomes4030028.
2. Mullin, R. Tufts study finds big rise in cost of drug development. *Chem. Eng. News* **2014**, *92*.
3. Ashburn, T. T.; Thor, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 673–683, doi:10.1038/nrd1468.
4. Gupta, S. C.; Sung, B.; Prasad, S.; Webb, L. J.; Aggarwal, B. B. Cancer drug discovery by repurposing: Teaching new tricks to old dogs. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 508–517, doi:10.1016/j.tips.2013.06.005.
5. Wong, P.; Houghton, P.; Kirsch, D. G.; Finkelstein, S. E.; Monjazeb, A. M.; Xu-Welliver, M.; Dicker, A. P.; Ahmed, M.; Vikram, B.; Teicher, B. A.; Coleman, C. N.; Machtay, M.; Curran, W. J.; Wang, D. Combining targeted agents with modern radiotherapy in soft tissue sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **2014**, *106*, 16–18, doi:10.1093/jnci/dju329.
6. Camphausen, K.; Cerna, D.; Scott, T.; Sproull, M.; Burgan, W. E.; Cerra, M. A.; Fine, H.; Tofilon, P. J. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by valproic acid. *Int. J. Cancer* **2005**, *114*, 380–386, doi:10.1002/ijc.20774.
7. Hutchison, S.; Rae, C.; Tesson, M.; Babich, J. W.; Boyd, M.; Mairs, R. J. Evaluation of Melanin-Targeted Radiotherapy in Combination with Radiosensitizing Drugs for the Treatment of Melanoma. *Cancer Oncol. Res.* **2014**, *2*, 58–67, doi:10.13189/cor.2014.020403.
8. Breslin, S.; O'Driscoll, L. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 240–249, doi:10.1016/j.drudis.2012.10.003.
9. Pampaloni, F.; Reynaud, E. G.; Stelzer, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 839–845, doi:10.1038/nrm2236.
10. Benton, G.; Arnaoutova, I.; George, J.; Kleinman, H. K.; Koblinski, J. Matrigel: From

- discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *79–80*, 3–18, doi:10.1016/j.addr.2014.06.005.
11. Marimuthu, M.; Rousset, N.; St-Georges-Robillard, A.; Lateef, M. A.; Ferland, M.; Mes-Masson, A.-M.; Gervais, T. Multi-size spheroid formation using microfluidic funnels. *Lab Chip* **2018**, *18*, 304–314, doi:10.1039/C7LC00970D.
 12. Patra, B.; Peng, C.-C.; Liao, W.-H.; Lee, C.-H.; Tung, Y.-C. Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21061–21072, doi:10.1038/srep21061.
 13. Unger, M. A.; Chou, H.-P.; Thorsen, T.; Scherer, A.; Quake, S. R. Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography. *Science (80-.).* **2000**, *288*, 113–116, doi:10.1126/science.288.5463.113.
 14. Thorsen, T.; Maerkl, S. J.; Quake, S. R. Microfluidic large-scale integration. *Science* **2002**, *298*, 580–4, doi:10.1126/science.1076996.
 15. Agresti, J. J.; Antipov, E.; Abate, A. R.; Ahn, K.; Rowat, A. C.; Baret, J.-C.; Marquez, M.; Klibanov, A. M.; Griffiths, A. D.; Weitz, D. A. Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 4004–4009, doi:10.1073/pnas.1002891107.
 16. Wang, Y.; Kim, M. H.; Tabaei, S. R.; Park, J. H.; Na, K.; Chung, S.; Zhdanov, V. P.; Cho, N.-J. Spheroid Formation of Hepatocarcinoma Cells in Microwells: Experiments and Monte Carlo Simulations. *PLoS One* **2016**, *11*, e0161915, doi:10.1371/journal.pone.0161915.
 17. Park, E. S.; Brown, A. C.; DiFeo, M. A.; Barker, T. H.; Lu, H. Continuously perfused, non-cross-contaminating microfluidic chamber array for studying cellular responses to orthogonal combinations of matrix and soluble signals. *Lab Chip* **2010**, *10*, 571–580, doi:10.1039/B919294H.
 18. R. Brunet, A.; Labelle, F.; Wong, P.; Gervais, T. Reconfigurable microfluidic magnetic valve arrays: Towards a radiotherapy-compatible spheroid culture platform for the combinatorial screening of cancer therapies. *Sensors* **2017**, *17*, doi:10.3390/s17102271.

19. Nge, P. N.; Rogers, C. I.; Woolley, A. T. Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2550–2583, doi:10.1021/cr300337x.
20. Folch, A. *Introduction to BioMEMS*; 2012; ISBN 9781439818398 (hardback).
21. Rousset, N.; Monet, F.; Gervais, T. Simulation-assisted design of microfluidic sample traps for optimal trapping and culture of non-adherent single cells, tissues, and spheroids. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 245, doi:10.1038/s41598-017-00229-1.
22. Beauchamp, M. J.; Nordin, G. P.; Woolley, A. T. Moving from millifluidic to truly microfluidic sub-100- μm cross-section 3D printed devices. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 4311–4319, doi:10.1007/s00216-017-0398-3.
23. Au, A. K.; Lee, W.; Folch, A. Mail-order microfluidics: evaluation of stereolithography for the production of microfluidic devices. *Lab Chip* **2014**, *14*, 1294–1301, doi:10.1039/C3LC51360B.
24. Bhattacharjee, N.; Urrios, A.; Kang, S.; Folch, A. The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics. *Lab Chip* **2016**, *16*, 1720–1742, doi:10.1039/C6LC00163G.
25. Waheed, S.; Cabot, J. M.; Macdonald, N. P.; Lewis, T.; Guijt, R. M.; Paull, B.; Breadmore, M. C. 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers. *Lab Chip* **2016**, *16*, 1993–2013, doi:10.1039/C6LC00284F.
26. Hickey, S. Chuck Hull: the father of 3D printing who shaped technology. *Guard. Int. Ed.* 2014.
27. Low, Z. X.; Chua, Y. T.; Ray, B. M.; Mattia, D.; Metcalfe, I. S.; Patterson, D. A. Perspective on 3D printing of separation membranes and comparison to related unconventional fabrication techniques. *J. Memb. Sci.* **2017**, *523*, 596–613, doi:10.1016/j.memsci.2016.10.006.
28. Gong, H.; Beauchamp, M.; Perry, S.; Woolley, A. T.; Nordin, G. P. Optical approach to resin formulation for 3D printed microfluidics. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 3627–3637, doi:10.1039/C5RA23855B.
29. Johnston, I. D.; McCluskey, D. K.; Tan, C. K. L.; Tracey, M. C. Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering. *J.*

- Micromechanics Microengineering* **2014**, *24*, doi:10.1088/0960-1317/24/3/035017.
- 30. Clear Cast Acrylic Sheets, Bars and Cubes.
 - 31. Comina, G.; Suska, A.; Filippini, D. PDMS lab-on-a-chip fabrication using 3D printed templates. *Lab Chip* **2014**, *14*, 424–30, doi:10.1039/c3lc50956g.
 - 32. Armani, D.; Liu, C.; Aluru, N. Re-configurable fluid circuits by PDMS elastomer micromachining. In *Technical Digest. IEEE International MEMS 99 Conference. Twelfth IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (Cat. No.99CH36291)*; IEEE, 1999; pp. 222–227.
 - 33. Fuard, D.; Tzvetkova-Chevolleau, T.; Decossas, S.; Tracqui, P.; Schiavone, P. Optimization of poly-di-methyl-siloxane (PDMS) substrates for studying cellular adhesion and motility. *Microelectron. Eng.* **2008**, *85*, 1289–1293, doi:10.1016/j.mee.2008.02.004.
 - 34. Gupta, S.; Carrillo, F.; Li, C.; Pruitt, L.; Puttlitz, C. Adhesive forces significantly affect elastic modulus determination of soft polymeric materials in nanoindentation. *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 448–451, doi:10.1016/j.matlet.2006.04.078.
 - 35. Bhattacharya, S.; Datta, A.; Berg, J. M.; Gangopadhyay, S. Studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength. *J. Microelectromechanical Syst.* **2005**, *14*, 590–597, doi:10.1109/JMEMS.2005.844746.
 - 36. Park, J. Y.; Kim, D. J.; Kim, S. R.; Baek, J. Y.; Sun, K.; Lee, S. H. Microfluidic valve employing the pH-responsive hydrogel microsphere as an actuating element. *Proc. 2006 Int. Conf. Microtechnologies Med. Biol.* **2006**, 35–38, doi:10.1109/MMB.2006.251483.
 - 37. Weibel, D. B.; Kruithof, M.; Potenta, S.; Sia, S. K.; Lee, A.; Whitesides, G. M. Torque-actuated valves for microfluidics. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4726–4733, doi:10.1021/ac048303p.
 - 38. Zhang, W.; Lin, S.; Wang, C.; Hu, J.; Li, C.; Zhuang, Z.; Zhou, Y.; Mathies, R. A.; Yang, C. J. PMMA/PDMS valves and pumps for disposable microfluidics. *Lab Chip* **2009**, *9*, 3088–94, doi:10.1039/b907254c.
 - 39. Gaspar, A.; Piyasena, M. E.; Daroczi, L.; Gomez, F. A. Magnetically controlled flexible

- valve for flow manipulation in polymer microfluidic devices. *Microfluid. Nanofluidics* **2008**, *525–531*, doi:10.1007/s10404-007-0204-1.
40. Yoko Yamanishi; Yu-Ching Lin; Fumihiro Arai Magnetically modified PDMS microtools for micro particle manipulation. In *2007 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems*; IEEE, 2007; pp. 753–758.
41. Jackson, W. C.; Tran, H. D.; O'Brien, M. J.; Rabinovich, E.; Lopez, G. P. Rapid prototyping of active microfluidic components based on magnetically modified elastomeric materials. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **2001**, *19*, 596, doi:10.1116/1.1350840.
42. Chawla, K.; Lee, S.; Lee, B. P.; Dalsin, J. L.; Messersmith, P. B.; Spencer, N. D. A novel low-friction surface for biomedical applications: Modification of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) with polyethylene glycol(PEG)-DOPA-lysine. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2009**, *90A*, 742–749, doi:10.1002/jbm.a.32141.
43. Palsule, A. S.; Clarson, S. J.; Widenhouse, C. W. Gamma Irradiation of Silicones. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2008**, *18*, 207–221, doi:10.1007/s10904-008-9205-0.
44. JT Baker Fluorescein Bar 100G M422-05 Available online: <https://www.labplanet.com/jt-baker-fluorescein-bar-100g-m422-05.html> (accessed on Dec 22, 2017).
45. ROSENBERG, S. A.; TEPPER, J.; GLATSTEIN, E.; COSTA, J.; BAKER, A.; BRENNAM, M.; DEMOSS, E. V.; SEIPP, C.; SINDELAR, W. F.; SUGARBAKER, P.; WESLEY, R. The Treatment of Soft-tissue Sarcomas of the Extremities. *Ann. Surg.* **1982**, *196*, 305–315, doi:10.1097/00000658-198209000-00009.
46. Hinderliter, P. M.; Minard, K. R.; Orr, G.; Chrisler, W. B.; Thrall, B. D.; Pounds, J. G.; Teeguarden, J. G. ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies. *Part. Fibre Toxicol.* **2010**, *7*, 36, doi:10.1186/1743-8977-7-36.
47. Raich, H.; Blümller, P. Design and construction of a dipolar Halbach array with a homogeneous field from identical bar magnets: NMR mandhalas. *Concepts Magn. Reson. Part B Magn. Reson. Eng.* **2004**, doi:10.1002/cmr.b.20018.

48. Fort, M.; Guet, S.; Colson-Durand, L.; Auzolle, C.; Belkacemi, Y. Role of radiation therapy in non-melanoma cancers, lymphomas and sarcomas of the skin: Systematic review and best practice in 2016. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**.
49. El-Bared, N.; Wong, P.; Wang, D. Soft tissue sarcoma and radiation therapy advances, impact on toxicity. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2015**, *16*, 19, doi:10.1007/s11864-015-0335-7.
50. Lounis, H.; Mes-Masson, A. M.; Dion, F.; Bradley, W. E.; Seymour, R. J.; Provencher, D.; Tonin, P. N. Mapping of chromosome 3p deletions in human epithelial ovarian tumors. *Oncogene* **1998**, *17*, 2359–2365.
51. Ouellet, V.; Zietarska, M.; Portelance, L.; Lafontaine, J.; Madore, J.; Puiffe, M.-L.; Arcand, S. L.; Shen, Z.; Hébert, J.; Tonin, P. N.; Provencher, D. M.; Mes-Masson, A.-M. Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 152, doi:10.1186/1471-2407-8-152.
52. Lacombe, J.; Phillips, S. L.; Zenhausern, F. Microfluidics as a new tool in radiation biology. *Cancer Lett.* **2016**, *371*, 292–300, doi:10.1016/j.canlet.2015.11.033.

ANNEXE B – DONNÉES BRUTES DES RÉSULTATS DE RÉSISTANCE DES VALVES À LA PRESSION

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6	Test 7	Test 8	Test 9
Dose de RT (Gy)	0	0	2	8	8	8	8	0	0
Température d'incubation (°C)	37	37	37	37	37	37	37	90	90
Temps d'incubation (jours)	7	7	7	0	3	7	7	2	2
Recouvrement de tige utilisé	Aucun	PDMSm	PDMSm	PDMSm	PDMSm	PDMSm	PDMSm	Aucun	PDMSm
État des valves pendant l'incubation	Ouvertes	Ouvertes	Ouvertes	Ouvertes	Ouvertes	Ouvertes	Fermées	Ouvertes	Ouvertes
Nombre d'essais	8	8	8	8	8	7	8	11	11
Résultats (mBar)	1000	600	800	1000	300	500	1000	3 bris	0 bris
	800	500	500	1000	300	300	600		
	1000	700	700	1000	500	100	600		
	1000	300	900	1000	500	300	600		
	1000	400	900	1000	800	400	500		
	1000	700	900	1000	700	400	600		
	1000	800	1000	700	600	500	1000		
	1000	400	800	700	600		900		