

Titre: De la microfluidique à l'optofluidique : intégration de la
Title: spectroscopie Raman pour l'oncologie personnalisée

Auteur: Tommy Brasseur
Author:

Date: 2026

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Brasseur, T. (2026). De la microfluidique à l'optofluidique : intégration de la
Citation: spectroscopie Raman pour l'oncologie personnalisée [Mémoire de maîtrise,
Polytechnique Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/76914/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/76914/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Thomas Gervais, & Frédéric Leblond
Advisors:

Programme: Génie Physique
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**De la microfluidique à l'optofluidique : intégration de la spectroscopie Raman
pour l'oncologie personnalisée**

TOMMY BRASSEUR

Département de génie physique

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie physique

Mai 2026

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

De la microfluidique à l'optofluidique : intégration de la spectroscopie Raman pour l'oncologie personnalisée

présenté par **Tommy BRASSEUR**

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

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

Caroline BOUDOUX, présidente

Thomas GERVAIS, membre et directeur de recherche

Frédéric LEBLOND, membre et codirecteur de recherche

Quoc-Huy Vincent TRINH, membre externe

DÉDICACE

À deux personnes qui n'ont jamais demandé pourquoi, comment, combien, si j'étais sûr.

Merci Maman, merci Papa

REMERCIEMENTS

Ce travail n'est rien d'autre que le reflet de toutes les personnes et de tout ce qui compose ma vie. Je remercie mes superviseurs, Thomas et Frédéric, qui ont accueilli mes idées parfois excentriques et m'ont permis de grandir dans leurs laboratoires. Merci de m'avoir fait confiance avec ce nouveau projet, et de m'avoir conseillé et guidé au fil des années. Merci également pour les environnements exceptionnellement accueillants que vos laboratoires offrent, où j'ai eu la chance de créer des amitiés et de rencontrer des personnes formidables. Ces valeurs et ces principes d'entraide sont le reflet de vous deux en tant que superviseurs.

Je tiens aussi à remercier sincèrement tous ceux et celles qui ont pris part à cette aventure, que ce soit pour m'aider, m'écouter, me conseiller ou simplement être présents. Merci à mes collègues et mentors à Polytechnique et au CRCHUM pour votre soutien et vos retours concrets. Je n'aurais pas pu y arriver sans l'aide de personnes passionnées comme Sabrina, Rodin, Maude, Maryam, Elena, Sara, Kim, Esmat et Xin Yu. Chacun d'entre vous a été un support à sa manière, et c'est un cadeau inestimable.

Merci à mes amis, qui ont rejoint cette aventure à différentes étapes, mais qui ont toujours fait preuve de patience et d'intérêt. Laurie, Salomé, Philippe, Christopher, Mehmet, Daniel, Thierry, vous connaissez probablement ce projet aussi bien que moi à ce stade, considérant combien vous m'avez entendu en parler.

Enfin, merci à ma famille, qui m'a toujours regardé évoluer de près ou de loin, soutenu, poussé à suivre mes passions et mes intérêts, et donné plus qu'il m'en faut pour affronter chaque jour.

Stéphane, Julie, vous êtes entrés dans cette aventure sans vraiment savoir à quoi vous attendre, et sans même que je le demande, vous avez toujours été là quand j'en avais besoin.

Ma mère, Nathalie. Mon père, Sylvain. Mon frère, Wesley. J'espère que lorsque vous lirez ces lignes, vous verrez toujours votre fils et frère, celui qui ne savait pas utiliser une clé hexagonale encore très récemment, celui qui vous a entraînés en Italie juste pour le plaisir, et celui qui a décidé de partir à l'aventure pour partager un peu de vous au monde entier.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is nothing more than a reflection of the people and experiences that shaped my life. I would like to thank my supervisors, Thomas and Frédéric, who welcomed my sometimes unconventional ideas and allowed me to grow within their laboratories. Thank you for trusting me with this new project, and for your guidance and support throughout the years. I am also grateful for the exceptionally welcoming environments you have created in your labs, where I had the chance to build friendships and meet truly remarkable people. These values of collaboration and support reflect who you are as supervisors.

I would also like to sincerely thank everyone who was part of this journey, whether by helping, listening, advising, or simply being present. Thank you to my colleagues and mentors at Polytechnique and the CRCHUM for your support and valuable feedback. I could not have done this without the help of passionate individuals such as Sabrina, Rodin, Maude, Maryam, Elena, Sara, Kim, Esmat, and Xin Yu. Each of you contributed in your own way, and that is an invaluable gift.

Thank you to my friends, who joined me at different stages of this journey but always showed patience and genuine interest. Laurie, Salomé, Philippe, Christopher, Mehmet, Daniel, Thierry. You probably know this project almost as well as I do by now, considering how much you have heard about it.

Finally, thank you to my family, who have always supported me, whether near or far, encouraging me to follow my passions and giving me more than I could ever need to face each day.

Stéphane, Julie. You joined this journey without really knowing what to expect, and without me even asking, you were always there when I needed you.

My mother, Nathalie. My father, Sylvain. My brother, Wesley. I hope that when you read these lines, you will still see your son and brother, the one who, not so long ago, did not know how to use a hex key, the one who dragged you to Italy just for the sake of it, and the one who chose to set out on this journey to share a part of you with the world.

RÉSUMÉ

Les approches actuelles en oncologie reposent majoritairement sur des analyses histopathologiques destructives pour caractériser la composition des tissus tumoraux. Bien que ces méthodes constituent la référence clinique, elles empêchent toute analyse fonctionnelle longitudinale sur un même échantillon, limitant l'étude dynamique des réponses aux traitements et l'utilisation du tissu disponible. Dans ce contexte, le développement de méthodes non destructives permettant d'accéder à l'information biochimique intrinsèque des tissus tumoraux représente un enjeu majeur.

Ce mémoire explore l'intégration de la spectroscopie Raman à des plateformes microfluidiques pour l'étude d'explants tumoraux vivants. L'objectif est de développer une approche optofluidique permettant à la fois l'identification du contenu tissulaire et le suivi longitudinal des réponses biologiques, sans recours à des marquages destructifs.

Dans un premier temps, une plateforme expérimentale a été développée en adaptant le Lumed Raman Platform aux contraintes microfluidiques. Un système de translation motorisé dérivé d'une imprimante 3D a été conçu pour permettre le positionnement automatisé de la sonde Raman sur des échantillons de petite taille. Cette infrastructure a été intégrée à un logiciel dédié développé dans le cadre de ce projet, LOCARS, assurant la coordination des déplacements et des acquisitions spectrales. Une sonde Raman modifiée, présentant une distance focale augmentée, a également été développée afin d'éviter tout contact avec les explants et d'assurer la reproductibilité des mesures. L'ensemble constitue une plateforme automatisée dont l'empreinte demeure comparable à celle d'un microspectromètre Raman standard, facilitant son intégration en environnement préclinique.

La capacité de la spectroscopie Raman à identifier le contenu tissulaire des explants tumoraux a ensuite été évaluée. Les résultats montrent qu'il est possible de distinguer de manière robuste les composantes épithéliales, adipeuses et stromales, à partir de signatures spectrales associées notamment aux lipides et aux protéines de la matrice extracellulaire. Une approche de classification basée sur le Spectral Angle Mapper a permis de discriminer ces classes, tandis qu'un score d'enrichissement dérivé des contributions spectrales a permis de projeter les échantillons sur un axe prédictif du contenu épithélial. Ce score présente une corrélation significative avec les mesures histopathologiques, démontrant que le signal Raman encode une information quantitative sur la composition tissulaire.

Une plateforme microfluidique dédiée à des acquisitions Raman a été conçue afin de permettre le maintien et le contrôle de l'environnement des explants tumoraux. Toutefois, des limitations techniques ont restreint son utilisation dans les expériences présentées. Ces travaux constituent néanmoins une étape de développement essentielle vers l'intégration complète de la microfluidique et de la spectroscopie Raman.

Enfin, la spectroscopie Raman a été utilisée dans un cadre longitudinal afin d'évaluer sa capacité à suivre des états biologiques et des réponses thérapeutiques sur des explants tumoraux. Des états distincts, incluant la prolifération, l'apoptose et la nécrose, ont pu être différenciés sur la base de signatures spectrales spécifiques. Des différences reproductibles ont également été observées entre des explants traités et non traités, tant en chimiothérapie qu'en radiothérapie. Bien que la discrimination fine des doses et des dynamiques temporelles demeure limitée dans les conditions étudiées, ces résultats démontrent la capacité de la technique à détecter des perturbations biologiques induites par les traitements. Ces observations restent préliminaires, en raison du nombre limité d'échantillons et de répétitions, mais elles encouragent la poursuite de ces travaux.

Dans l'ensemble, ce travail démontre la faisabilité d'une approche optofluidique combinant spectroscopie Raman et microfluidique pour l'étude non destructive d'explants tumoraux. La plateforme développée permet des acquisitions rapides et répétées sur un même échantillon, ouvrant la voie à une analyse dynamique des réponses tumorales. Malgré certaines limites, notamment liées à la qualité des échantillons et au nombre de patients étudiés, cette approche présente un fort potentiel pour le développement d'outils de recherche préclinique et, à terme, pour des applications en oncologie personnalisée.

ABSTRACT

Current approaches in oncology rely predominantly on destructive histopathological analyses to characterize the composition of tumor tissues. While these methods remain the clinical gold standard, they preclude longitudinal functional analysis of the same sample, thereby limiting the dynamic study of treatment responses and the efficient use of available tissue. In this context, the development of non-destructive methods capable of accessing the intrinsic biochemical information of tumor tissues represents a major challenge.

This thesis explores the integration of Raman spectroscopy with microfluidic platforms for the study of living tumor explants. The objective is to develop an optofluidic approach enabling both tissue content identification and longitudinal monitoring of biological responses, without the need for destructive labeling.

First, an experimental platform was developed by adapting the Lumed Raman Platform to microfluidic constraints. A motorized translation system derived from a 3D printer was designed to enable automated positioning of the Raman probe over small-scale samples. This infrastructure was integrated into a dedicated software developed for this project, LOCARS, which coordinates probe movement and spectral acquisition. A modified Raman probe with an increased working distance was also developed to avoid contact with the explants and ensure measurement reproducibility. Altogether, this system constitutes an automated platform with a physical footprint comparable to that of a standard Raman microspectrometer, facilitating its integration into preclinical environments.

The ability of Raman spectroscopy to identify the tissue composition of tumor explants was then evaluated. The results demonstrate that epithelial, adipose, and stromal components can be robustly distinguished based on spectral signatures associated in particular with lipids and extracellular matrix proteins. A classification approach based on the Spectral Angle Mapper enabled discrimination between these classes, while an enrichment score derived from spectral contributions allowed samples to be projected onto a predictive axis of epithelial content. This score showed a significant correlation with histopathological measurements, demonstrating that the Raman signal encodes quantitative information about tissue composition.

A dedicated microfluidic platform for Raman acquisition was also designed to enable maintenance and control of the explant microenvironment. However, technical limitations restricted its use in

the experiments presented. Nevertheless, this work represents an essential developmental step toward the full integration of microfluidics and Raman spectroscopy.

Finally, Raman spectroscopy was applied in a longitudinal framework to evaluate its ability to monitor biological states and treatment responses in tumor explants. Distinct states, including proliferation, apoptosis, and necrosis, were differentiated based on specific spectral signatures. Reproducible differences were also observed between treated and untreated explants, both in chemotherapy and radiotherapy contexts. Although fine discrimination of dose-response effects and temporal dynamics remains limited under the conditions studied, these results demonstrate the ability of the technique to detect treatment-induced biological perturbations. These findings remain preliminary, given the limited number of samples and experimental replicates, but they support further investigation.

Overall, this work demonstrates the feasibility of an optofluidic approach combining Raman spectroscopy and microfluidics for the non-destructive study of tumor explants. The developed platform enables rapid and repeated spectral acquisitions on the same sample, opening the way for dynamic analysis of tumor responses. Despite certain limitations, particularly related to sample quality and the number of patients studied, this approach shows strong potential for the development of preclinical research tools and, ultimately, applications in personalized oncology.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
ACKNOWLEDGMENTS.....	V
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXIII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Motivation	1
1.2 Dépendance contextuelle au tissu frais	4
1.3 Organisation de ce mémoire.....	5
1.4 Contributions de l’auteur.....	5
1.5 Impact du projet	6
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	7
2.1 Oncologie de précision.....	7
2.1.1 Oncologie classique et limites de l’approche populationnelle	7
2.1.2 Nécessité d’outils pour la médecine personnalisée	10
2.1.3 Avènement des modèles 3D en microfluidique	10
2.2 Microfluidique et modèles tumoraux	11
2.2.1 Laboratoires sur puces.....	12
2.2.2 Microfluidique pour l’oncologie	13

2.2.3	Limites.....	14
2.3	Imagerie en Oncologie	15
2.3.1	Les 3 axes d'une modalité: implications pour le choix d'une technique	15
2.3.2	Spectroscopie Raman pour l'oncologie.....	18
2.3.3	Cadre de travail et calibration	21
2.3.4	Limites de la spectroscopie Raman	22
2.3.5	Méthodes optiques et spectroscopie Raman en microfluidique	23
2.4	Raman et pathologie : fondements statistiques des approches appariées et non appariées 25	
2.4.1	Comparaison non appariée	26
2.4.2	Comparaison appariée	26
2.4.3	Conséquence sur la taille d'échantillonnage	27
2.4.4	Implication pour l'analyse des explants tumoraux.....	28
CHAPITRE 3	OBJECTIFS DE RECHERCHE	30
CHAPITRE 4	DÉVELOPPEMENT D'UNE PLATEFORME OPTOFLUIDIQUE INTÉGRÉE POUR LE SUIVI LONGITUDINAL D'EXPLANTS TUMORAUX.....	32
4.1	Contexte scientifique et technique	32
4.2	Le Lumed Raman Scanner	33
4.3	Sonde adaptée à des explants miniaturisés : Collaboration industrielle 1.....	35
4.4	Montage expérimental complet.....	37
4.5	Logiciel Optofluidique de Contrôle pour l'Acquisition par Raman Spectroscopy	38
4.5.1	Le module LOCARS.....	39
4.5.2	Communication, coordination des acquisitions et mouvement du scanner	41
CHAPITRE 5	IDENTIFICATION DU CONTENU TUMORAL DE TRANCHES TUMORALES PAR SPECTROSCOPIE RAMAN	50

5.1	Contexte scientifique.....	50
5.2	Méthode expérimentale	51
5.2.1	Cohorte de patients et critères de stratification	51
5.2.2	Préparation des échantillons et flux expérimental.....	52
5.2.3	Véhicule : Plaque à puits	53
5.2.4	Analyse histologique et par immunofluorescence	54
5.2.5	Acquisition spectroscopique Raman	55
5.2.6	Traitement du signal et contrôle de qualité	55
5.2.7	Classification.....	56
5.2.8	Analyse statistique et score d'enrichissement épithélial	56
5.3	Résultats	57
5.3.1	Validation histologique des catégories tissulaires.....	57
5.3.2	Signatures spectrales des compartiments tissulaires	58
5.3.3	Performance de classification des signatures Raman.....	59
5.3.4	Estimation du contenu épithélial à partir du signal Raman.....	62
5.4	Discussion et analyse	63
5.4.1	Validation biologique des signatures spectrales.....	63
5.4.2	Classification automatisée et variabilité inter-observateur	64
5.4.3	Encodage continu du contenu épithélial.....	65
5.5	Limite et perspective	66
CHAPITRE 6	CONCEPTION D'UNE PLATEFORME OPTOFLUIDIQUE	68
6.1	Plateforme expérimentale et mesures longitudinales : Collaboration industrielle 2	68
6.2	Modélisation de la plateforme optofluidique	69
6.3	Fabrication.....	71

6.4	Validation expérimentale	73
CHAPITRE 7 VALIDATION D'UNE APPROCHE SPECTRALE RAMAN POUR L'ÉTUDE DES DESTINS CELLULAIRES ET DES RÉPONSES THÉRAPEUTIQUES SUR DES EXPLANTS TUMORAUX MICRODISSÉQUÉS.....		
7.1	Intérêt d'une approche longitudinale non destructive en microfluidique	75
7.2	Méthode.....	76
7.2.1	Xénogreffes et Patients.....	76
7.2.2	Génération des MDTs.....	77
7.2.3	Plateforme pour la culture et le traitement des MDTs.....	77
7.2.4	Définition des états biologiques de référence	78
7.2.5	Induction des destins cellulaires.....	78
7.2.6	Exposition aux traitements thérapeutiques.....	79
7.2.7	Acquisition spectroscopique Raman	79
7.2.8	Traitement du signal et contrôle de qualité	80
7.2.9	Analyse histologique et par immunofluorescence	80
7.3	Résultats humains.....	81
7.3.1	Destins cellulaires	81
7.3.2	Réponse à la chimiothérapie	85
7.3.3	Réponse à la radiothérapie	88
7.3.4	Prolifération des explants	90
7.4	Discussion	93
CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE		
CHAPITRE 9 CONCLUSION		
RÉFÉRENCES.....		
ANNEXES		

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Résumé des avantages et limites de chaque approche en oncologie.....	23
Tableau 5.1 : Performances d’annotation et de classification des pathologistes versus le SAM découlant de chaque ensemble d’annotation.	61

LISTE DES FIGURES

- Figure 2.1 : Évolution de la prise de décision en oncologie, des paradigmes basés sur les populations (à gauche) vers les approches de stratification moléculaire et génétique (à droite).
..... 9
- Figure 2.2 : Évolution des technologies ayant conduit au développement des laboratoires sur puce (μ TAS) et des plateformes microfluidiques appliquées aux modèles tumoraux. Cette convergence technologique a permis la mise en place de systèmes capables de recréer des microenvironnements biologiques contrôlés et d'effectuer des analyses fonctionnelles intégrées dans les récentes années..... 12
- Figure 2.3 : Évolution des modèles tumoraux depuis les cultures de cellules 2D vers des tissus dérivés de patients (A). Évolution des plateformes d'analyse et d'expérience, depuis la plaque à puits vers des puces microfluidiques spécifiquement conçues pour les besoins expérimentaux (B)..... 14
- Figure 2.4 : Comparaison de diverses modalités d'imagerie en 3 axes caractéristiques. Le type d'information nécessaire ainsi que la disponibilité du tissu guident le choix de la modalité selon les 3 axes. Le quadrant d'intérêt pour des applications en microfluidique est celui en haut à droite, en couleur pêche..... 16
- Figure 2.5 : Représentation schématique des étapes d'un protocole d'acquisition de données par spectroscopie Raman pour l'oncologie, et du développement de modèles prédictifs basés sur l'apprentissage automatique. (1) Acquisition des spectres Raman dans différents contextes biologiques. (2) Enregistrement des données dans des formats exploitables par des outils analytiques courants, comme Python. (3) Application d'algorithmes de prétraitement intégrés dans la chaîne de traitement ORPL. (4) Entraînement, validation et test de modèles d'apprentissage automatique, avec évaluation des performances au moyen d'analyses de courbes ROC (Receiver Operating Characteristic). Reproduite sous license CC BY 4.0 ⁸². 20
- Figure 2.6 : Paysage non exhaustif des applications typiques de chacun des domaines concernés, axes de synergies et lacune d'un espace méthodologique liant les trois domaines..... 25

- Figure 4.1 : Spectre Raman du PDMS acquis sur une puce microfluidique. En rouge, les régions spectrales nécessaires pour mesurer un échantillon tumoral. En gris, les régions spectrales variant en fonction du diagnostic et du type de cancer. 33
- Figure 4.2 : (A) Vue d'ensemble de l'architecture logicielle des plateformes Lumed Raman, illustrant l'aspect modulaire de la conception¹¹⁴. (B) Contribution de ce travail, le module `lumed_scanner` qui permet de contrôler de façon externe le scanner présenté en (C). 34
- Figure 4.3 : Tracé de rayons pour le modèle original de la sonde Raman (A) et pour la nouvelle sonde développée par EMVision (B). Les tracés rouges sont les rayons incidents (longueur d'onde d'excitation) et les tracés bleus sont les rayons réfractés (longueur d'onde décalée). Les graphes sont produits par depuis Zeemax par Eric Marple, EMVision. 36
- Figure 4.4 : Montage expérimental complet de la plateforme optofluidique Raman développée dans ce travail. Le système comprend le spectromètre Raman Lumed piloté par le logiciel ORAS, un scanner motorisé permettant le positionnement automatisé de la sonde Raman au-dessus des échantillons et une plaque à puits en aluminium conçue pour minimiser le signal de fond Raman. Le logiciel LOCARS contrôle le déplacement du scanner et la séquence expérimentale, permettant l'acquisition automatisée de spectres Raman sur plusieurs explants tumoraux..... 38
- Figure 4.5 : Interface principale du logiciel LOCARS. Menu latéral repliable permettant d'accéder aux différentes sections du logiciel, sélection de modèles de dispositif et génération automatique de la grille de coordonnées associées, l'ensemble représentant le premier onglet de l'interface..... 41
- Figure 4.6 : Schéma fonctionnel illustrant l'intégration de la fonction `send_gcode` dans la chaîne de contrôle menant au déplacement du stage motorisé. 43
- Figure 4.7 : Génération automatisée des coordonnées des différents dispositifs utilisés à partir d'un fichier de configuration. (A) Illustration d'une puce microfluidique vue de dessous, où la grille rouge représente les positions générées pour le positionnement de la sonde au-dessus des puits. (B) Illustration d'une plaque à puits vue de dessous, où la grille rouge représente les positions générées pour le positionnement de la sonde au-dessus des puits. (C) Schéma fonctionnel résumant le processus de génération des coordonnées et leur utilisation pour l'automatisation des déplacements du scanner..... 44

Figure 4.8 : Vérification de l'alignement des supports d'acquisition Raman par vision caméra. (A)

Exemple d'une puce volontairement mal alignée par rapport aux axes du système, entraînant un angle détecté différent de l'orientation voulue. (B) Exemple d'une puce correctement positionnée dans le support d'alignement, où l'orientation mesurée correspond à l'alignement avec les axes du système de déplacement. (C) Exemple d'une plaque à puits volontairement mal alignée par rapport aux axes du système, entraînant un angle détecté différent de l'orientation voulue. (D) Exemple d'une plaque à puits correctement positionnée dans le support d'alignement, où l'orientation mesurée correspond à l'alignement avec les axes du système de déplacement. 47

Figure 4.9 : Schéma fonctionnel d'une séquence d'acquisition automatisée dans LOCARS.

Initialisation de la séquence, chargement des coordonnées et du point de calibration, génération des positions absolues puis déplacement successif vers chaque coordonnée sélectionnée. À chaque position, un signal `external_trigger` est envoyé à ORAS pour déclencher l'acquisition Raman, et le système attend la fin de la mesure avant de poursuivre vers la coordonnée suivante. Une fois la séquence terminée, la sonde retourne à l'origine relative et les coordonnées visitées sont marquées dans l'interface. 48

Figure 5.1: Schéma du protocole expérimental comparant la spectroscopie Raman à

l'histopathologie conventionnelle. Après résection chirurgicale et sectionnement du tissu, des acquisitions spectroscopiques Raman sont réalisées sur des tranches tissulaires intactes. Les mêmes tranches sont ensuite fixées, incluses en paraffine et colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E) afin d'obtenir une catégorisation histopathologique de référence (épithélium tumoral, stroma, tissu adipeux). Les données spectrales sont finalement traitées et utilisées pour entraîner un modèle d'apprentissage automatique visant l'identification tissulaire non destructive. 52

Figure 5.2 : Comparaison du signal spectral provenant d'une plaque à puits commerciale en

plastique et d'une plaque à puits en aluminium développée dans ce travail. Photographies d'une plaque standard de culture cellulaire (A) et de la plaque usinée dans un bloc massif d'aluminium (B). Spectres Raman représentatifs acquis à partir de la plaque de plastique (C) et d'aluminium (D). La plaque en aluminium ne montre aucun signal Raman significatif dans cette région, permettant des acquisitions spectrales sans interférence du support. 53

Figure 5.3 : Caractérisation histologique et par immunofluorescence des différentes catégories tissulaires sur des tranches de tissu entière de cancer ovarien obtenues de patients. Images représentatives d'immunofluorescence montrant le marquage nucléaire (DAPI, bleu) et le marquage épithélial (Pan-CK, rouge), accompagnées des coupes correspondantes colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E). Les tissus présentant une forte proportion d'épithélium tumoral montrent un marquage Pan-CK abondant, tandis que les échantillons stromaux et adipeux présentent un signal épithélial limité. Les graphiques quantifient la densité nucléaire (noyaux par μm^2) ainsi que la proportion de cellules Pan-CK positives pour chaque catégorie tissulaire. Les points représentent des échantillons individuels, les barres indiquant la moyenne. Les barres d'échelle sont de 500 μm 58

Figure 5.4 : Profils spectraux Raman moyens des différents compartiments tissulaires. Panneau supérieur : spectres Raman moyens ($\pm$ écart-type) du tissu adipeux (vert, $n = 112$), de l'épithélium tumoral (orange, $n = 48$) et du stroma (bleu, $n = 72$). Le tissu adipeux présente des pics d'intensité plus marqués, reflétant une signature lipidique dominante, tandis que les spectres de l'épithélium et du stroma montrent des différences plus subtiles. Panneau inférieur : différence spectrale moyenne $\Delta(E-S)$ entre épithélium tumoral et stroma. Les valeurs positives indiquent une intensité plus élevée dans l'épithélium. Les régions marquées par des astérisques correspondent aux intervalles présentant des différences statistiquement significatives..... 59

Figure 5.5: Performance de classification des signatures Raman pour les différentes classes tissulaires. (A) Courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) obtenues pour la classification du tissu gras, de l'épithélium tumoral et du stroma à partir des données spectroscopiques Raman du pathologiste 1. La ligne pointillée représente une classification aléatoire ($\text{AUC} = 0.5$). (B) Performances quantitatives du modèle d'apprentissage automatique contre les entraînements des pathologistes, incluant les métriques principales (exactitude, sensibilité et spécificité) pour chaque classe tissulaire..... 60

Figure 5.6 : Corrélation entre le score d'enrichissement épithélial Raman et le contenu épithélial mesuré histologiquement. Chaque point représente une tranche tissulaire ($n = 60$), colorée selon sa catégorie dominante (stroma en bleu, épithélium en orange). L'axe horizontal correspond au pourcentage d'épithélium tumoral déterminé par immunofluorescence, et l'axe

vertical au score d'enrichissement épithélial dérivé des signatures Raman. La ligne pointillée indique le seuil séparant dominance stromale et épithéliale. Une corrélation de Spearman $\rho = 0.63$ ($p < 0.001$) met en évidence une relation monotone significative entre le contenu épithélial et le signal spectroscopique. 62

Figure 6.1 : Comparaison entre une puce microfluidique conventionnelle en PDMS et la puce optofluidique développée dans ce travail. Rangée du haut : configuration classique en PDMS, où le signal Raman est affecté par la contribution spectrale du matériau ainsi que par la réfraction du faisceau laser à l'interface, limitant la qualité des mesures. Rangée du bas : nouvelle puce intégrant des micropuits en aluminium usinés, permettant une incidence directe du faisceau sur l'échantillon et une réduction significative du signal parasite. Cette architecture assure un meilleur confinement de l'explant, une compatibilité avec un écoulement contrôlé et une acquisition Raman plus robuste en conditions longitudinales. . 69

Figure 6.2 : Modèle mathématique développé conjointement avec Cornelia Iachimov. **Error! Bookmark not defined.**

Figure 6.3 : Résultats du modèle mathématique avec les résultats expérimentaux, les simulations COMSOL et les résultats de modélisation par analogie hydraulique-électrique. L'erreur maximale commise est de 6.1%. 71

Figure 6.4 : Étapes de fabrication de la plateforme optofluidique en PDMS. Rangée du haut : moules négatifs imprimés en résine et remplis de PDMS avant polymérisation. Rangée du bas : dispositifs en PDMS démoulés, incluant les deux couches et dispositif final après assemblage PDMS à PDMS par activation plasma, intégrant les micropuits et les accès fluidiques. 72

Figure 6.5 : Signatures Raman principalement obtenues en contexte microfluidique. Les matériaux conventionnels (ex. PDMS) introduisent des contributions spectrales qui interfèrent avec les régions d'intérêt de l'échantillon. Les MDTs sur l'aluminium et dans les puits d'aluminium ne présentent pas de signal Raman, sans pics marqués, confirmant l'absence de contribution Raman significative. 74

Figure 7.1: Comparaison des états biologiques de prolifération, d'apoptose et de nécrose dans des explants tumoraux à l'aide de marqueurs histologiques et par immunofluorescence. Les graphiques présentent le nombre de noyaux Ki-67 positifs (#Ki67+), la fraction d'aire apoptotique (CC3+), la proportion de tissu épithélial (Pan-CK+), le nombre total de noyaux

ainsi que la taille des MDTs. Le nombre total de noyaux tend à diminuer dans les conditions traitées, particulièrement en nécrose, tandis que la taille des MDTs reste stable. Les points représentent des échantillons individuels et les barres indiquent la moyenne $\pm$ écart-type. Les barres d'échelle sont 100 microns. Les différences statistiques ont été évaluées par ANOVA à double effet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns : non significatif). 82

Figure 7.2: Spectres Raman moyens ($\pm$ écart-type) des explants tumoraux en conditions proliférative (P, noir, $n = 28$), apoptotique (A, jaune, $n = 29$) et nécrotique (N, rouge, $n = 31$), après normalisation SNV. Les trois conditions présentent des profils spectraux globalement similaires, avec des différences d'intensité observées dans plusieurs régions, notamment autour de $850\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, 1004 cm^{-1} , $1300\text{-}1375\text{ cm}^{-1}$, 1454 cm^{-1} et 1656 cm^{-1} 83

Figure 7.3 : Analyse statistique des différences spectrales entre états biologiques. Carte de chaleur représentant les différences spectrales moyennes entre les conditions proliférative (P), apoptotique (A) et nécrotique (N) pour des bandes Raman sélectionnées (715 , 873 , 1004 , 1030 , 1265 , 1320 , 1340 , 1447 et 1675 cm^{-1}). Les valeurs indiquent les différences moyennes entre conditions, tandis que l'intensité de la couleur reflète l'amplitude de la différence (bleu foncé = différence plus élevée). Les astérisques indiquent le niveau de significativité statistique (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Des différences significatives sont observées principalement entre les conditions proliférative et nécrotique, ainsi qu'entre apoptose et nécrose, tandis que la comparaison entre prolifération et apoptose présente des variations plus limitées. 85

Figure 7.4 : Signatures Raman de la réponse à la chimiothérapie. Spectres Raman moyens ($\pm$ écart-type) des explants tumoraux prolifératifs (P4, $n = 29$) et traités à la chimiothérapie à dose clinique (C1_J5, $n=31$) et (C2_J5, $n = 27$) après normalisation SNV. Les profils spectraux sont globalement similaires, avec des variations d'intensité observées dans certaines régions, notamment autour de 675 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} et 1450 cm^{-1} . La carte de chaleur présente les différences spectrales moyennes entre les conditions pour des bandes sélectionnées. La région autour de 675 cm^{-1} apparaît comme la plus discriminante entre les conditions traitées et prolifératives, avec des différences significatives indépendamment du temps. Les autres bandes montrent des variations plus modestes et moins systématiques. Les

astérisques indiquent le niveau de significativité statistique (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)..... 87

Figure 7.5 : Signatures Raman de la réponse à la radiothérapie en fonction de la dose. Spectres Raman moyens ($\pm$ écart-type) des explants tumoraux prolifératifs (P4, $n = 29$) et irradiés à (2 Gy, $n = 25$) et (8 Gy, $n=27$), après normalisation SNV. Les profils spectraux demeurent globalement similaires entre les conditions, avec des variations d'intensité observées dans certaines régions du spectre. La carte de chaleur présente les différences spectrales moyennes entre les conditions pour des bandes sélectionnées. La région autour de 675 cm^{-1} apparaît comme la plus discriminante entre les conditions irradiées et prolifératives, avec des différences significatives pour les deux doses. Les autres bandes montrent des variations plus modestes, avec peu de différences systématiques entre 2 Gy et 8 Gy. Les astérisques indiquent le niveau de significativité statistique (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)..... 89

Figure 7.6 : Signatures Raman en fonction du temps de culture (condition proliférative). Spectres Raman moyens ($\pm$ écart-type) des explants tumoraux en condition proliférative aux jours 1, 4, 5 et 6, après normalisation SNV. Les profils spectraux sont globalement similaires entre les temps de culture, sans variation marquée dans l'ensemble du spectre. La carte de chaleur présente les différences spectrales moyennes entre les temps pour des bandes sélectionnées. Certaines variations sont observées, notamment autour de 675 cm^{-1} , 940 cm^{-1} et 1035 cm^{-1} , ainsi que dans les régions associées aux vibrations CH (1460 cm^{-1}) et amide I (1660 cm^{-1}). Toutefois, ces différences ne suivent pas de tendance temporelle cohérente. Ces résultats suggèrent l'absence de dynamique spectrale reproductible associée à la prolifération dans les conditions expérimentales étudiées, en accord avec les observations histologiques. Les astérisques indiquent le niveau de significativité statistique (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)..... 91

Figure 7.7 : Analyse histologique de la qualité du tissu primaire utilisé pour les expériences de prolifération. (A) Exemple de tissu présentant une forte composante stromale et des régions nécrotiques. (i) Vue macroscopique de la tranche tissulaire, (ii) zoom sur une région représentative montrant une faible cellularité et une organisation stromale, et (iii) MDT généré à partir de ce tissu, présentant une faible densité cellulaire. (B) Exemple de tissu tumoral de bonne qualité, caractérisé par une forte cellularité et une organisation épithéliale homogène.

(i) Vue macroscopique, (ii) zoom sur une région représentative, et (iii) MDT correspondant.

(C) Tissu utilisé dans les expériences de prolifération de ce mémoire. Bien que macroscopiquement similaire à un tissu tumoral viable (i), l'analyse histologique révèle une hétérogénéité importante avec la présence de régions stromales et nécrotiques (ii, iv), conduisant à la génération de MDTs de qualité variable (iii, v). Les barres d'échelle sont de 500 microns (Ai), Bi), Ci)), de 200 microns (Aii), Bii), Cii)) et 100 microns (Aiii), Biii), Ciii)).

..... 92

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN Acide désoxyribonucléique

ARN Acide ribonucléique

AUC Area Under the Curve

CCD Charge-Coupled Device

CT Computed Tomography

DOT Diffuse Optical Tomography

DRS Diffuse Reflectance Spectroscopy

EDM Electrical Discharge Machining

FLIM Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

FTIR Fourier Transform Infrared Spectroscopy (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier)

H&E Hematoxylin and Eosin staining (hématoxyline-éosine)

HBSS Hanks' Balanced Salt Solution

IF Immunofluorescence

IHC Immunohistochemistry (immunohistochimie)

IRM Imagerie par résonance magnétique

LDA Linear Discriminant Analysis

LOCARS Logiciel Optofluidique de Contrôle pour l'Acquisition par Raman Spectroscopy

LRP Lumed Raman Platform

LRS Lumed Raman System

LSPR Localized Surface Plasmon Resonance

MDTs Microdissected Tumor Explants (explants tumoraux microdisséqués)

MEMS Micro-Electro-Mechanical Systems (systèmes microélectromécaniques)

NIRS Near-Infrared Spectroscopy

OCT Optical Coherence Tomography

ORAS Open Raman Acquisition Software

ORPL Open Raman Processing Library

Pan-CK Pan-cytokeratin

PCA Principal Component Analysis

PDE Patient-Derived Explants

PDMS Polydiméthylsiloxane

PET Positron Emission Tomography

POC Point-of-Care

ROC Receiver Operating Characteristic

SAM Spectral Angle Mapper

SERS Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

SERRS Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy

SESORS Surface-Enhanced Spatially Offset Raman Spectroscopy

SNV Standard Normal Variate

SORS Spatially Offset Raman Spectroscopy

SRM Standard Reference Material

SVM Support Vector Machine

TOML Tom's Obvious Minimal Language

UV-VIS Spectroscopie ultraviolet-visible

XDE Xenograft-Derived Explants

μTAS Micro Total Analysis Systems

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Motivation

Le cancer est, de manière générale, reconnu par la communauté scientifique comme une maladie complexe, mortelle et encore largement incomprise. Outre l'étude de cette maladie pour mieux la prévenir, des efforts considérables sont mis en place pour améliorer son traitement une fois diagnostiquée. Cependant, étant de nature très complexe, quasiment unique à chaque personne, la plupart des traitements qui reposent sur des études statistiques dérivées de grandes populations peuvent s'avérer mal adaptés au contexte personnel de la maladie. Pour pallier ce problème, le laboratoire de microfluidique pour l'oncologie (μ FO Lab) à Polytechnique Montréal, en partenariat avec des chercheurs du Centre de Recherche du CHUM, travaille assidûment depuis plus d'une décennie à développer des tests personnalisés afin de mieux adapter les thérapies disponibles aux caractéristiques de chaque tumeur, et ultimement d'augmenter les chances de survies des patients.

En récoltant des biopsies localement et suivant un protocole rigoureux pour découper en fragments d'un demi-millimètre ce tissu, il devient possible de garder l'échantillon en vie hors du corps humain pendant plusieurs jours. Cette viabilité prolongée est notamment rendue possible par le contrôle des échanges diffusifs des différentes particules, en particulier l'apport en oxygène. La conception de microsystèmes adaptés permet ainsi de maintenir des conditions physiologiques stables à l'échelle du tissu, même en l'absence de perfusion active. Ceci permet de préserver l'intégrité du tissu similairement au cas *in vivo*. Nous obtenons donc un modèle beaucoup plus représentatif du comportement de la tumeur dans l'humain.

Ce modèle 3D se présente donc comme beaucoup plus pertinent que les cultures cellulaires 2D, où l'absence d'architecture tridimensionnelle entraîne la perte d'un grand nombre d'interactions et de phénomènes biologiques essentiels. Équipé de ce nouveau modèle, il est possible de tester des traitements de première ligne directement sur ces échantillons tumoraux microdisséqués (MDTs, pour Microdissected Tissues), notamment des traitements de chimiothérapie, radiothérapie, curiethérapie, qui sont devenus les axes de recherche du μ FO Lab. En l'espace de deux semaines, l'échantillon est récolté, microdisséqué, mis en culture, traité, fixé selon les standards pathologiques, et analysé. Ultimement, une recommandation pourrait alors être transmise au médecin traitant pour l'aider à guider le plan de traitement du patient. La microfluidique appliquée

à l'oncologie s'impose donc comme un outil de médecine personnalisée puissant et polyvalent, ouvrant la voie à des économies monétaires et temporelles considérables, et proposant une approche véritablement sur mesure pour chaque cas individuel.

Toutefois, ces plateformes microfluidiques basent à ce jour leurs résultats sur les analyses pathologiques mentionnées plus tôt. Ces analyses sont destructives, basées sur le marquage et requièrent des manipulations qui peuvent s'échelonner sur plusieurs jours, voire semaines. Une de ces analyses est par exemple l'identification du type de tissu (épithélium tumoral, stroma ou tissu adipeux), où la caractérisation du contenu épithélial est indispensable pour évaluer la réponse à un traitement. Cette analyse est donc implicitement limitée par la destruction de l'échantillon lors de l'identification, empêchant toute mesure ou corrélation ultérieure entre le tissu traité et le tissu identifié. Comme le tissu détruit est inutilisable, ce qui est contraignant lorsque peu de tissu est disponible, deux options lors des se présentent : nous pouvons faire les expériences sans regarder la nature du tissu restant, et espérer qu'à la fin des deux semaines de travail, du tissu représentatif soit présent dans l'expérience. Il s'agit ici d'un pari, et je vous révèle sans surprise : nous perdons plus souvent qu'autrement. La deuxième option est plus fondée dans la rigueur scientifique, mais limitée dans son efficacité : nous pouvons tester en amont une partie de l'échantillon, le détruire ce faisant, et regarder le contenu de cette partie de la biopsie. De là, s'il semble y avoir quelque chose d'utilisable, nous extrapolons que les chances sont élevées que sur le reste de l'échantillon, il y ait aussi quelque chose d'utilisable. Or, comme nous l'expliquions, ceci empêche des mesures corrélées, rajoute des manipulations au processus, et ne garantit rien pour autant. Cette approche, quoique meilleure que le hasard, produit des résultats peu satisfaisants.

Une solution potentielle à ce projet est la spectroscopie Raman. La spectroscopie Raman est une technique optique non invasive basée sur l'interaction inélastique entre la lumière laser incidente et les modes vibrationnels des molécules. Lorsqu'une molécule est excitée par le laser, une petite fraction des photons est réémise avec une énergie légèrement différente : c'est la diffusion Raman, nommée depuis le célèbre physicien indien C.V. Raman. Les décalages énergétiques mesurés correspondent aux niveaux vibrationnels accessibles de la molécule. La représentation de ces décalages sous forme d'intensité en fonction du déplacement Raman constitue le spectre Raman, propre à la composition moléculaire de l'échantillon. En biologie, la complexité des macromolécules implique que ces spectres sont extrêmement riches en information, au point d'agir

comme une véritable « empreinte digitale » moléculaire permettant de différencier plusieurs types de tissu.

C'est le fondement du Lumed lab, où ce principe physique est devenu une approche prometteuse en chirurgie. Le chirurgien pourrait, en direct, prendre une mesure spectroscopique, et des algorithmes d'apprentissage machine combinés à du traitement de données permettent une décision en quelques secondes : il reste du cancer, ou il n'en reste pas. Cela permettrait, une fois accepté largement, d'accélérer la détection de marges saines en chirurgies, un processus qui en ce moment est long et fastidieux. Lors d'une chirurgie oncologique, l'évaluation peropératoire des marges repose généralement sur une analyse histopathologique rapide de type *frozen section*. L'échantillon est prélevé, acheminé au laboratoire de pathologie, puis congelé, sectionné et coloré principalement par Hématoxyline et Éosine (H&E) avant d'être interprété par un pathologiste. Ce processus permet une évaluation en temps quasi réel, mais demeure limité par son caractère destructif et par les délais nécessaires à la préparation et à l'analyse. En cas de marges positives, des itérations successives peuvent prolonger la durée de la procédure chirurgicale. On comprend donc que la spectroscopie Raman offrirait une solution rapide, avec moins de main-d'œuvre, pas de consommables, et un détachement progressif de la dépendance pathologique, une science précise et rigoureuse, mais subjective dans l'essence et à la merci de l'humain qui regarde l'image. L'utilisation d'un modèle d'apprentissage machine permettrait donc une décision standardisée.

La spectroscopie Raman a déjà démontré son efficacité en clinique, en particulier en chirurgie où elle est utilisée en temps réel pour identifier la présence de tissu tumoral. Cependant, les conditions microfluidiques sont radicalement différentes : volumes infiniment plus petits, géométrie confinée, matériaux optiquement complexes, et quantité de tissu limitée à l'extrême. On ne peut donc pas simplement transposer la méthode telle quelle : il faut l'adapter.

Adapter ce deuxième domaine au premier est précisément l'objectif de ce projet. En tenant compte des différences et limites propres à la microfluidique, parmi lesquelles devoir interroger des échantillons environ 40 000 fois plus petits qu'en milieu clinique, nous cherchons à démontrer que la microfluidique pour l'oncologie peut atteindre un niveau supérieur de qualité et de précision en intégrant des méthodes optiques qui ont déjà fait leurs preuves dans des domaines biomédicaux connexes.

1.2 Dépendance contextuelle au tissu frais

Les approches expérimentales reposant sur des explants tumoraux dérivés de patients présentent un avantage majeur en termes de fidélité biologique, mais elles demeurent fortement dépendantes de l'accès à du tissu frais provenant de procédures chirurgicales. Cette contrainte logistique limite la reproductibilité des études, complique la planification expérimentale et restreint l'accès aux échantillons à des contextes cliniques spécifiques où la disponibilité du tissu est immédiate. De plus, les délais entre la résection chirurgicale et la mise en culture imposent des contraintes organisationnelles importantes pour l'acheminement, la préparation et l'analyse des échantillons.

Dans ce contexte, la cryopréservation des explants tumoraux constitue une stratégie potentiellement intéressante pour améliorer l'accessibilité et la standardisation de ces modèles expérimentaux. La possibilité de congeler et de biobanquer des tissus tumoraux tout en conservant leur viabilité et leur architecture pourrait permettre de découpler la collecte clinique du travail expérimental, facilitant ainsi le transport des échantillons, leur partage entre les institutions et la constitution de cohortes expérimentales plus larges.

Au début de ce projet de maîtrise et à la suite de travaux de stage, ces considérations ont motivé une investigation méthodologique portant sur la cryopréservation d'explants tumoraux par vitrification. Un protocole de vitrification adapté aux tissus tumoraux microdisséqués a été développé et évalué afin de déterminer dans quelle mesure les explants pouvaient être congelés, entreposés puis réanimés tout en conservant leur viabilité cellulaire et certaines caractéristiques fonctionnelles. Les résultats de cette étude, actuellement disponibles sous forme de prépublication, suggèrent que la cryopréservation peut permettre la récupération de tissus viables et utilisables pour certaines analyses expérimentales, tout en ouvrant la voie à la biobanque d'explants tumoraux. Cependant, malgré ces résultats encourageants, la cryopréservation introduit inévitablement des perturbations biologiques liées aux processus de congélation et de décongélation. Ces perturbations peuvent affecter l'intégrité cellulaire, les interactions du microenvironnement tumoral ou certains profils d'expression moléculaire. Même si la vitrification se révèle meilleure que les techniques classiques pour la cryopréservation, elle ne permet pas un maintien parfait des conditions d'un tissu frais. Dans le cadre d'un travail visant à caractériser finement des réponses biologiques et biochimiques à l'échelle tissulaire (ce mémoire), ces altérations potentielles peuvent constituer un facteur confondant important.

Pour cette raison, bien que la cryopréservation représente une voie prometteuse pour améliorer l'accessibilité et la logistique des modèles d'explants tumoraux, le présent travail expérimental se concentre exclusivement sur l'utilisation de tissus frais, afin de maximiser la fidélité biologique et la pertinence des observations dans un contexte humain. L'article lié à l'étude méthodologique sur la cryopréservation est disponible [actuellement sur BioRxiv](#).

1.3 Organisation de ce mémoire

La suite de ce mémoire est divisée en 6 chapitres. Le chapitre 2 présente une revue de littérature liant les trois grands domaines présents dans ce projet, soit l'oncologie de précision, la microfluidique et la spectroscopie Raman, expliquant les concepts importants de chacun. Le chapitre 3 présente succinctement les objectifs de ce travail. Le chapitre 4 explique la conception et le design de la plateforme optofluidique. Le chapitre 5 présente une étude de cas qui est une première application du système sur l'évaluation du contenu tumoral d'un échantillon. Le chapitre 6 présente la conception d'une plateforme microfluidique adaptée aux mesures par spectroscopie Raman. Le chapitre 7 présente les résultats préliminaires d'une évaluation du destin cellulaire d'un échantillon ainsi que de la réponse au traitement. Le chapitre 8 discute brièvement des limites et perspectives de ce travail

1.4 Contributions de l'auteur

La rédaction de ce mémoire constitue mon œuvre dans son intégralité. À l'exception des figures provenant de la littérature et dûment citées, ainsi que de certaines sous-figures présentant des images histopathologiques, l'ensemble des figures présentées sont de ma conception.

Les expériences, leur planification ainsi que leur mise en œuvre ont été conçues et dirigées par moi. Les images et analyses histopathologiques ont été planifiées conjointement avec Sabrina Ritch, PhD, collaboratrice essentielle à ce projet. Dr. Ritch a réalisé l'ensemble des marquages histologiques convenus et effectué les analyses d'images associées.

J'ai dirigé le développement du système expérimental ainsi que la réalisation de l'ensemble des expériences présentées dans ce mémoire. Mes travaux s'inscrivent dans le cadre des axes de recherche des deux laboratoires auxquels j'appartiens, mais ce projet constitue la première implémentation de cette approche spécifique. L'identification du projet et sa formulation ont été réalisées par moi, en collaboration avec mes directeurs de recherche, qui ont contribué à l'orientation scientifique globale et à l'encadrement du travail. Les échantillons biologiques utilisés

dans ce projet ont été fournis dans le cadre de collaborations institutionnelles approuvées selon les protocoles éthiques en vigueur du Centre de Recherche du CHUM ainsi que de l'École Polytechnique Montréal. Les tissus de patients obtenus ont majoritairement été fournis par Dr. Elizabeth Tremblay.

Pour l'ensemble du contenu de ce mémoire, j'ai développé mes propres protocoles expérimentaux, ainsi que les outils logiciels nécessaires, incluant une interface graphique dédiée et des scripts d'analyse des données. Les méthodes d'analyse spectroscopique sont adaptées de codes modèles initialement développés par Frédérick Dallaire, puis modifiées et intégrées dans mon propre pipeline de traitement.

1.5 Impact du projet

Ce travail a mené à une présentation orale à SPIE Photonics West en 2025, à une déclaration d'invention recommandée pour licenciement par Poly-Axelys, ainsi qu'à la préparation d'un manuscrit scientifique en cours de rédaction.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Oncologie de précision

L'oncologie moderne a connu des avancées majeures au cours des dernières décennies, passant d'approches essentiellement anatomopathologiques à des stratégies intégrant des marqueurs moléculaires, génétiques et immunologiques¹⁻³. En effet, les décisions cliniques en oncologie ont été historiquement largement guidées par des classifications fondées sur l'organe d'origine, l'avancée de la maladie et des critères visuels. L'intégration progressive de biomarqueurs spécifiques (mutations génétiques, profils d'expression, signatures immunologiques) a permis d'affiner cette stratification par caractéristiques morphologiques, mais aussi fonctionnelles et génétiques⁴⁻⁷.

L'émergence de la médecine de précision repose ainsi sur l'idée que les tumeurs ne constituent pas des entités homogènes, mais des environnements biologiques complexes dont les caractéristiques moléculaires et cellulaires influencent directement la réponse thérapeutique^{5,6,8}. Toutefois, malgré ces avancées considérables, la majorité des connaissances en oncologie provient encore d'analyses réalisées sur des tissus fixés, sectionnés, lysés, fournissant des mesures instantanées et statiques d'un système dynamique⁹. Par cette nature non appariée et majoritairement destructive, une part substantielle de la littérature oncologique demeure structurée autour d'études populationnelles. Les conclusions de ces études reposent sur des associations statistiques à l'échelle de cohortes plutôt que sur des observations fonctionnelles répétées d'un même tissu. Ceci limite l'inférence causale directe à l'échelle individuelle. Les décisions thérapeutiques s'appuient ainsi sur des moyennes statistiques et des modèles de stratification dérivés de cette littérature, ce qui, malgré leur utilité clinique, ne capture pas pleinement la complexité biologique d'un tissu tumoral individuel⁹⁻¹³.

Dans ce contexte, l'oncologie de précision vise à dépasser les approches populationnelles pour adapter les traitements aux caractéristiques propres à chaque patient et à chaque tumeur. Cette ambition repose non seulement sur l'identification spécifique de la maladie, mais également sur le développement d'outils capables de capturer la complexité biologique et fonctionnelle des tissus tumoraux uniques.

2.1.1 Oncologie classique et limites de l'approche populationnelle

La prise en charge oncologique s'est construite autour d'une classification fondée sur l'organe d'origine, le type histologique et le stade tumoral¹⁴. Les stratégies thérapeutiques ont longtemps

été définies à partir de cohortes de patients regroupés selon ces critères, et validées par des essais cliniques dont l'analyse repose sur des moyennes populationnelles¹⁵⁻¹⁸. Cette approche a permis des progrès substantiels en termes de survie et de standardisation des traitements, en particulier avec l'amélioration des techniques chirurgicales, de la radiothérapie et de la chimiothérapie systémique.

Au cours des dernières décennies, l'intégration de la biologie moléculaire a profondément transformé le paysage oncologique¹⁴. L'identification de mutations oncogéniques, le développement de thérapies ciblées et l'émergence de l'immunothérapie ont permis d'affiner la stratification des patients et d'introduire des traitements plus spécifiques^{19,20}. Parallèlement, les techniques de marquage moléculaire se sont considérablement développées. L'immunohistochimie (IHC), les panels multimarqueurs, l'hybridation *in situ* et, plus récemment, les approches « omiques », comme transcriptomiques, métabolomiques, protéomiques ou génomiques, ont enrichi la capacité de caractérisation et stratification tumorale²¹⁻²⁴.

Cependant, malgré ces avancées majeures, le paradigme dominant reste fondé sur l'analyse destructive des tissus²⁵. La majorité des connaissances biologiques en oncologie proviennent d'échantillons fixés, inclus en paraffine, sectionnés ou lysés. Ces inclusions introduisent évidemment de la variabilité dans les résultats de par la nature du test²⁵⁻²⁷. Ces procédures, bien que standardisées, fournissent des informations issues de coupes statiques d'un système dynamique. Elles impliquent également une destruction du tissu analysé.

Cette dépendance aux approches destructives pose plusieurs limites. D'une part, la quantité de tissu disponible est souvent restreinte, en particulier pour les biopsies de petite taille ou les cancers rares^{28,29}. D'autre part, l'impossibilité d'interroger le même échantillon de manière répétée limite les analyses et tests longitudinaux ou multiparamétriques sur un même volume tissulaire, un des seuls cas possibles de mesures répétées étant les biopsies liquides^{26,30,31}. Enfin, les essais cliniques, bien qu'essentiels, continuent de s'appuyer sur des réponses moyennes à l'échelle de groupes de patients, laissant persister une variabilité significative sur le plan de l'individu dans les réponses thérapeutiques^{16,32,33}.

Ainsi, si l'oncologie moderne a bénéficié d'avancées considérables en matière de ciblage moléculaire et de stratification, son socle méthodologique demeure largement ancré dans des approches populationnelles et destructives, ce qui constitue une limite opérationnelle dans la perspective d'une véritable médecine personnalisée et sur mesure.

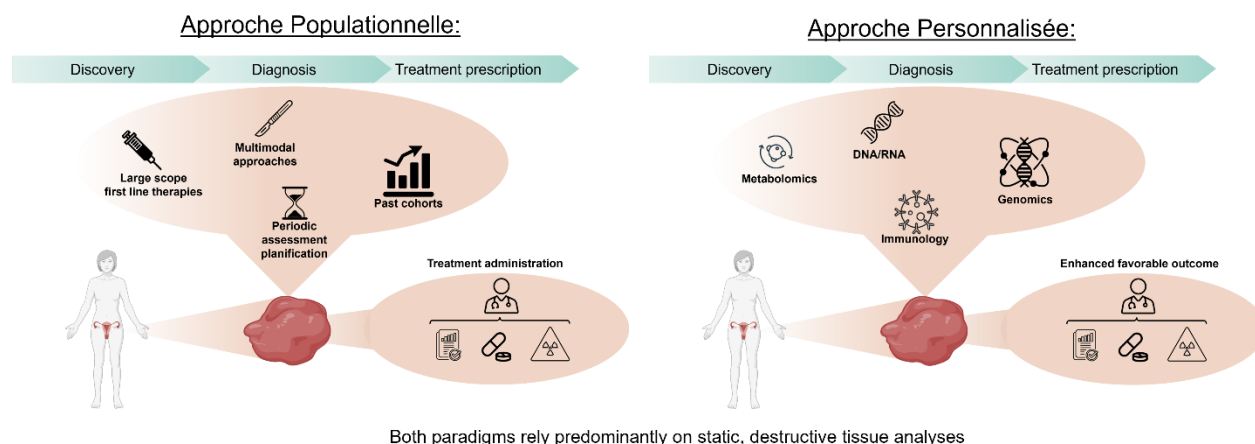


Figure 2.1 : Évolution de la prise de décision en oncologie, des paradigmes basés sur les populations (à gauche) vers les approches de stratification moléculaire et génétique (à droite).

Les tumeurs présentent en effet une variabilité à la fois intertumorale (entre patients atteints d'un même cancer, pris en compte dans l'approche populationnelle) et intra-tumorale, où différentes régions d'un même tissu peuvent exhiber des signatures génétiques, métaboliques ou phénotypiques distinctes (ce qui n'est pas pris en compte dans l'approche populationnelle)³³⁻³⁵. Ainsi, jusqu'à aussi peu que 0.0005% d'une tumeur peut être représentée dans une biopsie, liquide ou solide³³. Dans ce contexte, les biopsies ponctuelles ne représentent qu'un échantillonnage spatial partiel, parfois extrêmement limité, susceptible de ne pas refléter l'ensemble de la diversité biologique tumorale^{36,37}. Cette complexité est d'autant plus critique que les analyses conventionnelles, étant destructives, empêchent toute interrogation répétée d'un même échantillon, limitant l'observation à une mesure unique dans le temps^{38,39}.

Ainsi, bien que l'approche populationnelle permette de capturer la variabilité entre patients, elle ne permet pas d'accéder à la dynamique et à l'hétérogénéité fonctionnelle d'un tissu tumoral individuel. Combinée au caractère destructif des méthodes analytiques, cette limitation constitue un obstacle à l'évaluation directe et répétée des réponses thérapeutiques à l'échelle d'un même échantillon.

2.1.2 Nécessité d'outils pour la médecine personnalisée

La reconnaissance de l'hétérogénéité tumorale met en évidence la nécessité d'outils capables d'aller au-delà d'une analyse moléculaire ponctuelle pour décrire l'ensemble d'une tumeur. Le profilage statique (ADN, ARN, protéines) fournit essentiellement une mesure instantanée des altérations tumorales sans permettre de prédire de manière fiable la réponse thérapeutique individuelle ni de capturer les phénotypes dépendants du microenvironnement tumoral ou les adaptations dynamiques induites par le traitement^{40,41}. La relation génotype à phénotype demeure incomplètement élucidée, et les altérations véritablement mesurables restent limitées. Même lorsqu'une cible est identifiée, la réponse clinique n'est pas garantie. Ces limites sont particulièrement marquées pour les agents cytotoxiques, dont la sensibilité tumorale est difficilement prédictible sur la seule base génétique, et l'efficacité varie grandement entre patients⁴².

Dans ce contexte, l'intégration d'approches fonctionnelles *ex vivo* s'impose afin de mesurer et caractériser directement les vulnérabilités biologiques d'un tissu tumoral viable. De tels outils doivent préserver l'architecture tridimensionnelle et les interactions endogènes entre cellules tumorales, stroma, compartiment vasculaire et immunitaire, ces composantes étant déterminantes dans la réponse thérapeutique^{42,43}. Les plateformes microfluidiques et les cultures organotypiques répondent à cette exigence en permettant la stimulation, la perfusion et l'analyse contrôlée de tissus intacts tout en maintenant leur intégrité structurelle. Elles offrent en outre la possibilité de multiplexage sur des échantillons limités^{43,44} et autorisent un suivi longitudinal non destructif (via perfusion contrôlée, imagerie répétée et suivi en temps réel) afin de capturer l'évolution temporelle de la réponse tumorale et des interactions tumeur-microenvironnement⁴⁵⁻⁵⁰.

Ainsi, le développement de systèmes de microfluidique appliqués aux explants tumoraux vivants et de dispositifs de *live explant monitoring* s'inscrit comme une réponse méthodologique directe aux limites du profilage statique, en intégrant les dimensions spatiale, fonctionnelle et temporelle nécessaires à une oncologie véritablement personnalisée.

2.1.3 Avènement des modèles 3D en microfluidique

Historiquement, les modèles *in vitro* utilisés en oncologie reposaient majoritairement sur des cultures bidimensionnelles (2D), dans lesquelles les cellules sont cultivées en monocouche sur des surfaces planes (boîtes de Petri ou flasques). Bien que ces systèmes soient simples et

reproductibles, ils ne permettent pas de reproduire l'architecture tridimensionnelle des tissus ni les interactions complexes entre cellules et microenvironnement.

Un corpus substantiel de travaux a démontré au cours des dernières décennies que les modèles tumoraux tridimensionnels (3D) reproduisent plus fidèlement plusieurs caractéristiques clés des tumeurs *in vivo*, notamment la complexité architecturale, les interactions cellule à cellule et cellule à matrice, ainsi que l'établissement de gradients physiologiques tels que les régimes hypoxiques et normoxiques⁵¹⁻⁵³. Ils constituent ainsi des modèles plus représentatifs pour l'étude des mécanismes tumoraux et la prédiction de la réponse aux traitements.

Parmi ces modèles, les sphéroïdes et organoïdes permettent de reconstruire certaines propriétés tumorales à partir de cellules isolées, tandis que les explants tumoraux dérivés de patients conservent directement l'architecture native du tissu ainsi qu'une partie de son microenvironnement, incluant les compartiments stromaux et immunitaires. Ces différentes approches s'inscrivent dans une transition vers des systèmes expérimentaux visant à mieux capturer la complexité biologique des tumeurs.

L'émergence de ces modèles 3D répond ainsi directement aux limites des approches statiques et destructives, en permettant l'étude de tissus dans un contexte plus physiologique et fonctionnel. Toutefois, leur maintien, leur contrôle expérimental et leur analyse requièrent des plateformes adaptées capables de reproduire et de stabiliser leur microenvironnement sur des échelles spatiales et temporelles pertinentes. Le domaine de la microfluidique répond à ces besoins.

2.2 Microfluidique et modèles tumoraux

Face aux limites des approches statiques en oncologie de précision, la microfluidique s'est progressivement imposée comme une plateforme technologique permettant le contrôle fin d'environnements biologiques au sein de dispositifs miniaturisés. Fondée sur des régimes physiques caractérisés par des écoulements laminaires, une dominance des forces visqueuses et un transport diffusif contrôlé, elle offre un cadre dans lequel les flux, les gradients et les interfaces peuvent être précisément maîtrisés spatialement et temporellement.

Ces propriétés permettent de concevoir des plateformes intégrées capables de recréer des microenvironnements biologiques complexes de manière reproductible. Ces dispositifs, regroupés sous le terme de laboratoires sur puce, constituent aujourd'hui un cadre central pour l'étude dynamique de modèles tumoraux sur plusieurs jours, plutôt que de manière statique.

2.2.1 Laboratoires sur puces

Les laboratoires sur puce (μ TAS), issus de la convergence des technologies de microfabrication et de la microélectronique, permettent de miniaturiser et d'intégrer sur un même dispositif des fonctions analytiques complexes⁵⁴⁻⁵⁶. Leur objectif est de reproduire, à échelle réduite, des environnements expérimentaux contrôlés tout en améliorant la reproductibilité et l'automatisation des analyses.

Ces systèmes permettent notamment la culture de cellules dans des environnements contrôlés, la modulation de conditions expérimentales et l'étude dynamique de réponses biologiques. Dans le contexte oncologique, l'intégration de la microfluidique aux problématiques oncologiques s'est imposée comme un domaine particulièrement dynamique, en raison de la nécessité de reproduire et contrôler finement le microenvironnement tumoral. La capacité à moduler spatialement et temporellement les gradients de nutriments, d'oxygène, de signaux moléculaires et de traitements pharmacologiques confère à ces dispositifs un intérêt particulier pour la modélisation fonctionnelle des tissus tumoraux et la prédiction à la réponse thérapeutique.

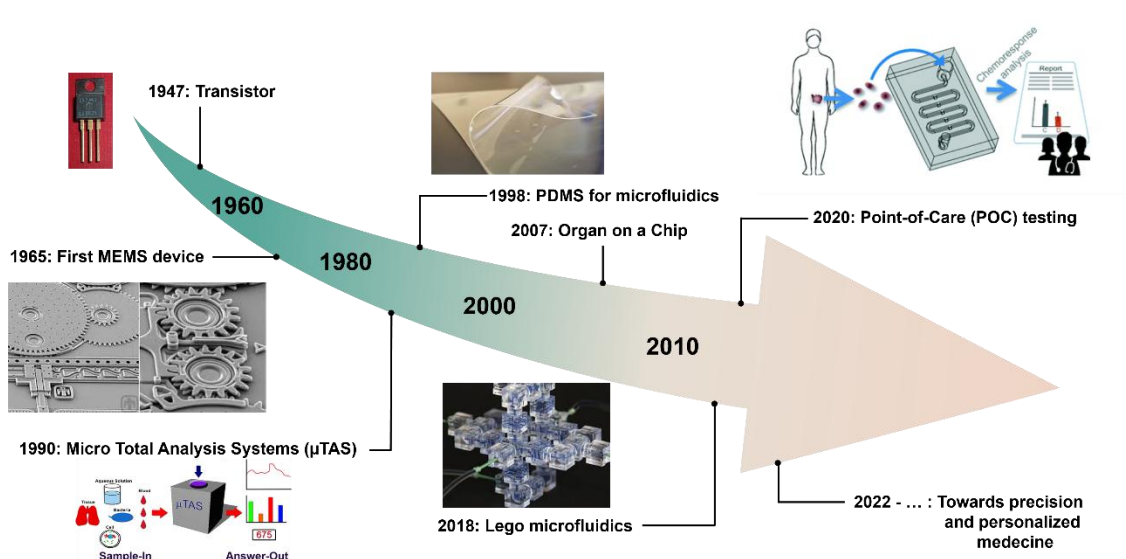


Figure 2.2 : Évolution des technologies ayant conduit au développement des laboratoires sur puce (μ TAS) et des plateformes microfluidiques appliquées aux modèles tumoraux. Cette convergence technologique a permis la mise en place de systèmes capables de recréer des microenvironnements biologiques contrôlés et d'effectuer des analyses fonctionnelles intégrées dans les récentes années.

2.2.2 Microfluidique pour l'oncologie

Les modèles tumoraux sur puce (*tumor-on-chip*) regroupent un ensemble de systèmes permettant de cultiver des cellules tumorales dans des environnements contrôlés et dynamiques. Parmi ceux-ci, les sphéroïdes et organoïdes sont largement utilisés : ils sont formés à partir de suspensions cellulaires, seules ou en co-culture avec des fibroblastes, cellules endothéliales ou immunitaires, dans des architectures compartimentées sous perfusion dynamique⁵⁷⁻⁵⁹. Ces systèmes permettent l'étude contrôlée de phénomènes tels que l'hypoxie ou la réponse aux traitements, mais leur formation homogène limite leur capacité à reproduire l'hétérogénéité tumorale native.

Pour surmonter cette limite, des modèles basés sur des tissus dérivés de patients ont été développés. Contrairement aux organoïdes reconstruits *in vitro*, qui conservent plusieurs caractéristiques génétiques et phénotypiques de la tumeur d'origine mais peu de composantes du microenvironnement, les explants tumoraux vivants préservent l'architecture native du tissu, la matrice extracellulaire ainsi que des populations stromales et immunitaires telles que les fibroblastes, lymphocytes, macrophages et cellules endothéliales^{43,60,61}. Ces explants peuvent provenir directement de patients (*patient-derived explants*, PDE) ou de modèles murins xénotreffés (*xenograft-derived explants*, XDE), permettant d'accéder à différents degrés de contrôle expérimental et de représentativité biologique. Une fois microdisséqués en fragments d'environ 350 µm (MDTs), ils peuvent être maintenus sous perfusion, permettant le maintien de la morphologie et des profils d'expression sur 7 à 14 jours^{45,47,62}.

Ces plateformes ont démontré une capacité à prédire la réponse à des traitements cytotoxiques et permettent un multiplexage de conditions expérimentales à partir d'un échantillon limité^{44,63-65}. Ces propriétés en font des modèles particulièrement adaptés à l'étude fonctionnelle des tissus tumoraux dans des environnements contrôlés.

Parallèlement, des efforts ont été réalisés pour intégrer des systèmes analytiques en temps réel à ces systèmes. Toutefois, la majorité des approches restent dépendantes de validations histopathologiques, et les analyses omiques sont encore fréquemment interprétées en référence à celles-ci⁶⁶. Ce décalage entre complexité des modèles et capacité d'analyse constitue un enjeu central.

2.2.3 Limites

Malgré ces avancées, plusieurs limitations persistent. La principale réside dans la dépendance aux analyses histopathologiques pour la validation des résultats, introduisant un goulot d'étranglement en termes de temps, de traitement des données et de variabilité inter-observateur^{67,68}.

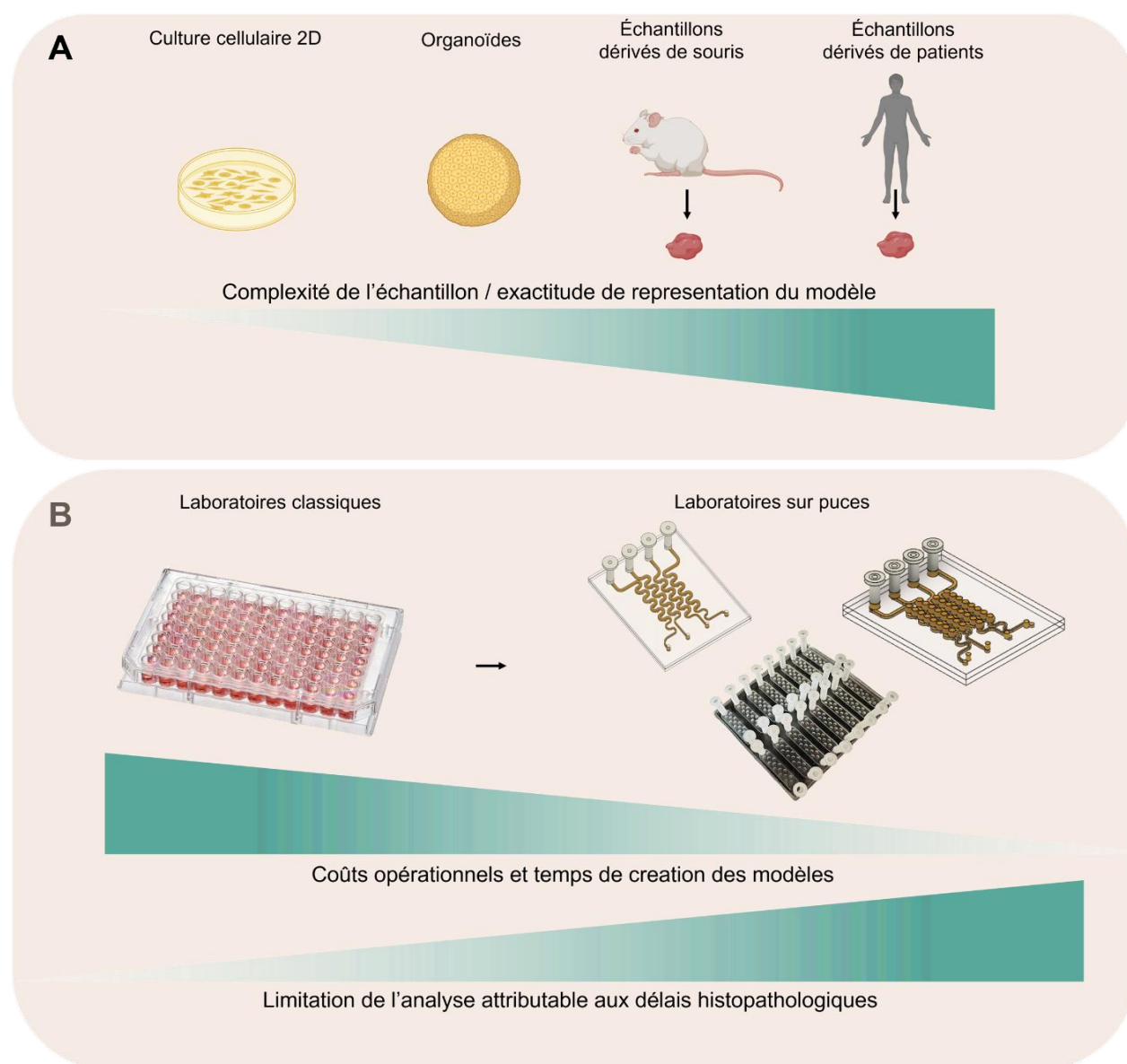


Figure 2.3 : Évolution des modèles tumoraux depuis les cultures de cellules 2D vers des tissus dérivés de patients (A). Évolution des plateformes d'analyse et d'expérience, depuis la plaque à puits vers des puces microfluidiques spécifiquement conçues pour les besoins expérimentaux (B).

Par ailleurs, le débit expérimental des plateformes microfluidiques dépasse maintenant la capacité d'analyse de l'histopathologie, créant un décalage entre génération de données et interprétation^{66,69}.

Enfin, l'identification de la composition tissulaire des explants demeure problématique. En raison de l'hétérogénéité tumorale, certains échantillons peuvent être partiellement bénins. La validation histopathologique étant réalisée a posteriori et de manière destructive, elle peut conduire à l'invalidation de résultats après plusieurs jours d'expérimentation. Avoir une technique d'identification non destructive de la composition d'un tissu pourrait régler ce problème. Les techniques d'imageries biomédicales sont toutes désignées pour ce besoin.

2.3 Imagerie en Oncologie

L'imagerie biomédicale regroupe un ensemble étendu de techniques permettant de visualiser, caractériser et quantifier des structures et des processus biologiques à différentes échelles spatiales et temporelles, du niveau moléculaire à l'organe entier. Sans enlever au mérite de certaines techniques, la présente section se concentre sur les modalités d'imagerie ayant une application directe ou émergente en oncologie, en particulier celles utilisées pour la détection, la caractérisation et l'analyse des tissus tumoraux au niveau de la cellule ou des caractéristiques biochimiques.

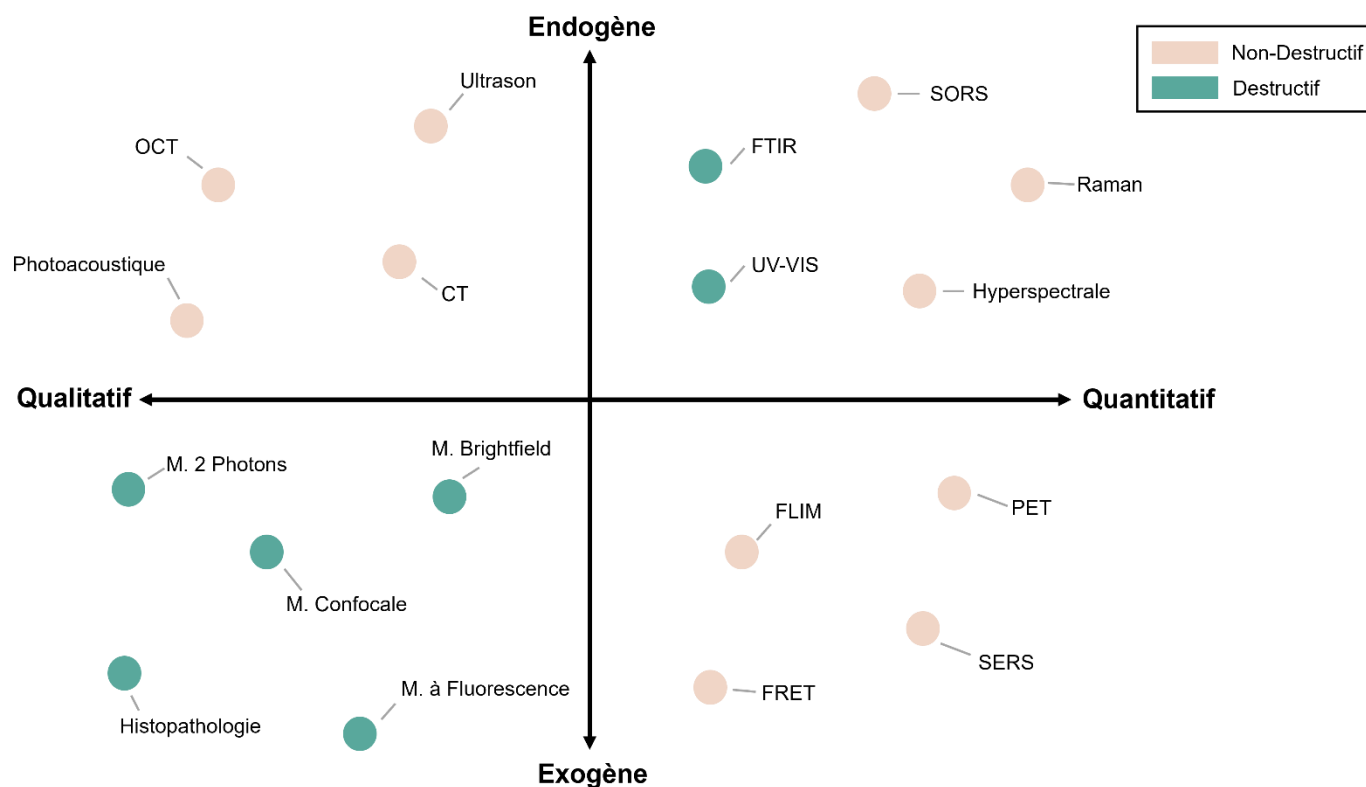
L'imagerie en oncologie constitue un outil indispensable du diagnostic, permettant la stratification des maladies et le suivi thérapeutique de manière non invasive. La capacité à localiser une lésion, à en caractériser l'extension et à en analyser les propriétés biologiques conditionne directement les décisions cliniques. Le développement des modalités d'imagerie s'inscrit alors dans un effort continu visant à accéder, de manière non invasive ou minimale invasive, à une information toujours plus spécifique et pertinente. Ainsi, un travail considérable a été fait pour comprendre comment voir à travers le corps humain, et le choix d'une technique par rapport à une autre ne peut être dissocié des mécanismes physiques qui la gouvernent. Comprendre l'interaction entre la lumière et la matière biologique devient alors une étape essentielle pour orienter rationnellement la sélection d'une modalité adaptée aux contraintes et aux objectifs oncologiques.

2.3.1 Les 3 axes d'une modalité: implications pour le choix d'une technique

Les modalités d'imagerie oncologique peuvent être groupées selon trois axes méthodologiques : leur caractère qualitatif ou quantitatif, leur nature destructive ou non destructive, et leur dépendance à un marquage exogène, c'est-à-dire l'utilisation d'une « étiquette » apposée à la cible tel qu'un fluorophore, un radioisotope, ou un élément de contraste⁷⁰. Une table présente en Annexe A les

principales modalités d'imageries en oncologie. Ces modalités sont également classées selon les trois axes décrits à la Figure 2.4.

Les approches qualitatives reposent principalement sur l'observation morphologique et structurale des tissus, permettant d'identifier des anomalies d'architecture ou des contrastes macroscopiques,



comme en histopathologie conventionnelle, en imagerie en contraste ou en tomographie par cohérence optique, où l'interprétation demeure largement dépendante de l'analyse visuelle et de l'expertise clinique.

Figure 2.4 : Comparaison de diverses modalités d'imagerie en 3 axes caractéristiques. Le type d'information nécessaire ainsi que la disponibilité du tissu guident le choix de la modalité selon les 3 axes. Le quadrant d'intérêt pour des applications en microfluidique est celui en haut à droite, en couleur pêche.

À l'inverse, les modalités quantitatives visent à extraire des paramètres mesurables et reproductibles, tels que des intensités spectrales, des coefficients d'absorption ou des concentrations relatives de biomarqueurs, afin d'objectiver le signal et de permettre des comparaisons inter-échantillons standardisées, un aspect particulièrement déterminant en oncologie pour la stratification tumorale et l'évaluation fine de la réponse thérapeutique^{70,71}.

Un second axe de distinction concerne le caractère destructif de la mesure. L’histopathologie, l’immunohistochimie ou les analyses omiques nécessitent généralement une fixation, une coloration ou une lyse tissulaire, rendant impossible toute mesure répétée sur un même échantillon vivant⁷⁰. Ces approches offrent une résolution moléculaire élevée, mais au prix de la viabilité du tissu.

Enfin, certaines techniques reposent sur l’utilisation d’agents de contraste ou de marqueurs exogènes. Les approches, généralement par fluorescence ciblée ou par immunofluorescence, permettent une détection spécifique de protéines ou de voies biologiques, mais introduisent des étapes supplémentaires de préparation et peuvent perturber le microenvironnement étudié. Elles nécessitent également une connaissance préalable des cibles d’intérêt⁷⁰.

Dans un contexte de modèles tumoraux en microfluidique et de leur étude, ces caractéristiques guident le choix d’une technique. La nécessité d’une quantification reproductible, d’une interrogation non destructive et d’une analyse globale sans marquage de la composition biochimique du tissu oriente vers des techniques capables de fournir une signature moléculaire intrinsèque sans recours à un marquage externe. Cette description est représentée par les techniques dans le quadrant supérieur droit dans la Figure 2.4, de couleur pêche. Ces techniques spectrales (SORS, SERS, Hyperspectrale et Raman) doivent également être faciles à utiliser pour le personnel médical. La spectroscopie Raman répond le mieux à ces critères, considérant la complexité accrue des autres techniques. La spectroscopie Raman permet d’obtenir une empreinte vibrationnelle spécifique des constituants moléculaires présents dans le tissu en mesurant la diffusion inélastique associée aux modes vibrationnels intrinsèques des biomolécules⁷². Elle fournit une information quantitative sur la composition biochimique relative, sans fixation, sans coloration et sans destruction immédiate de l’échantillon⁷³. Contrairement aux approches ciblées, elle ne nécessite pas d’hypothèses préalables sur la nature du biomarqueur d’intérêt, ce qui est particulièrement pertinent dans un contexte de forte hétérogénéité tumorale⁷².

Ainsi, au regard des exigences méthodologiques précédemment discutées, notamment la nécessité d’une analyse non destructive, quantitative et représentative du microenvironnement tumoral, la spectroscopie Raman constitue une modalité cohérente avec les contraintes des plateformes microfluidiques et des modèles *ex vivo* vivants^{72,74}.

2.3.2 Spectroscopie Raman pour l'oncologie

La spectroscopie Raman repose sur la diffusion inélastique de la lumière, au cours de laquelle un échange d'énergie a lieu entre le photon incident et les modes vibrationnels des molécules du milieu. Le photon diffusé subit ainsi un décalage fréquentiel directement lié aux vibrations des liaisons chimiques, fournissant une signature biochimique intrinsèque du tissu. Bien que ce processus soit intrinsèquement peu efficace (environ un photon sur un million pour un décalage Stokes), il permet d'accéder à une information moléculaire spécifique sans recours à un marquage externe, ce qui en fait une approche particulièrement adaptée à l'analyse des tissus biologiques en oncologie^{75,76}. Le photon incident excite la molécule vers un état virtuel instable, suivi d'une réémission rapide. Si la molécule revient vers un état vibrationnel plus élevé, le photon diffusé présente une énergie plus faible (diffusion Stokes), processus le plus probable. À l'inverse, un retour vers un état vibrationnel plus faible correspond à la diffusion anti-Stokes, mais ce processus est encore plus rare, typiquement dix à cent fois plus faible que la diffusion Stokes^{77,78}. Le décalage Raman, généralement exprimé en nombre d'onde (cm^{-1}), est indépendant de la longueur d'onde d'excitation et dépend uniquement des modes vibrationnels propres à la molécule.

Dans les tissus biologiques, le spectre Raman correspond à la somme des contributions des biomolécules présentes et est souvent décrit comme une empreinte biochimique globale. Certaines bandes caractéristiques sont associées à des familles moléculaires majeures, notamment les protéines (amide I, approx. 1650 cm^{-1}), les lipides (approx. 1440 cm^{-1}) ou les acides nucléiques (approx. $800\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$), permettant d'accéder à la composition relative du tissu. La région dite *fingerprint* ($500\text{-}2000 \text{ cm}^{-1}$) contient la majorité de ces signatures et constitue la zone la plus exploitée en biomédecine, tandis que la région *high-wavenumber* peut fournir des informations complémentaires, notamment sur le contenu en eau^{79,80}.

La section efficace de diffusion Raman étant proportionnelle à λ^{-4} , des longueurs d'onde courtes favoriseraient théoriquement le signal. Toutefois, la fluorescence intrinsèque des tissus limite leur utilisation. En pratique, les applications biomédicales privilégient des longueurs d'onde dans le proche infrarouge (approx. $785\text{-}830 \text{ nm}$), correspondant à la fenêtre optique des tissus, afin d'optimiser le compromis entre signal Raman, fluorescence et pénétration optique^{77,81}.

En oncologie, ces signatures vibrationnelles sont particulièrement pertinentes, car la transformation tumorale s'accompagne d'altérations biochimiques mesurables, notamment au niveau des contenus lipidique, protéique et nucléique.

Le spectre Raman d'un tissu tumoral reflète ainsi un équilibre biochimique distinct de celui d'un tissu sain. La discrimination repose généralement sur des variations relatives et des motifs spectraux globaux, analysés à l'aide de méthodes multivariées plutôt que sur l'identification d'une bande isolée.

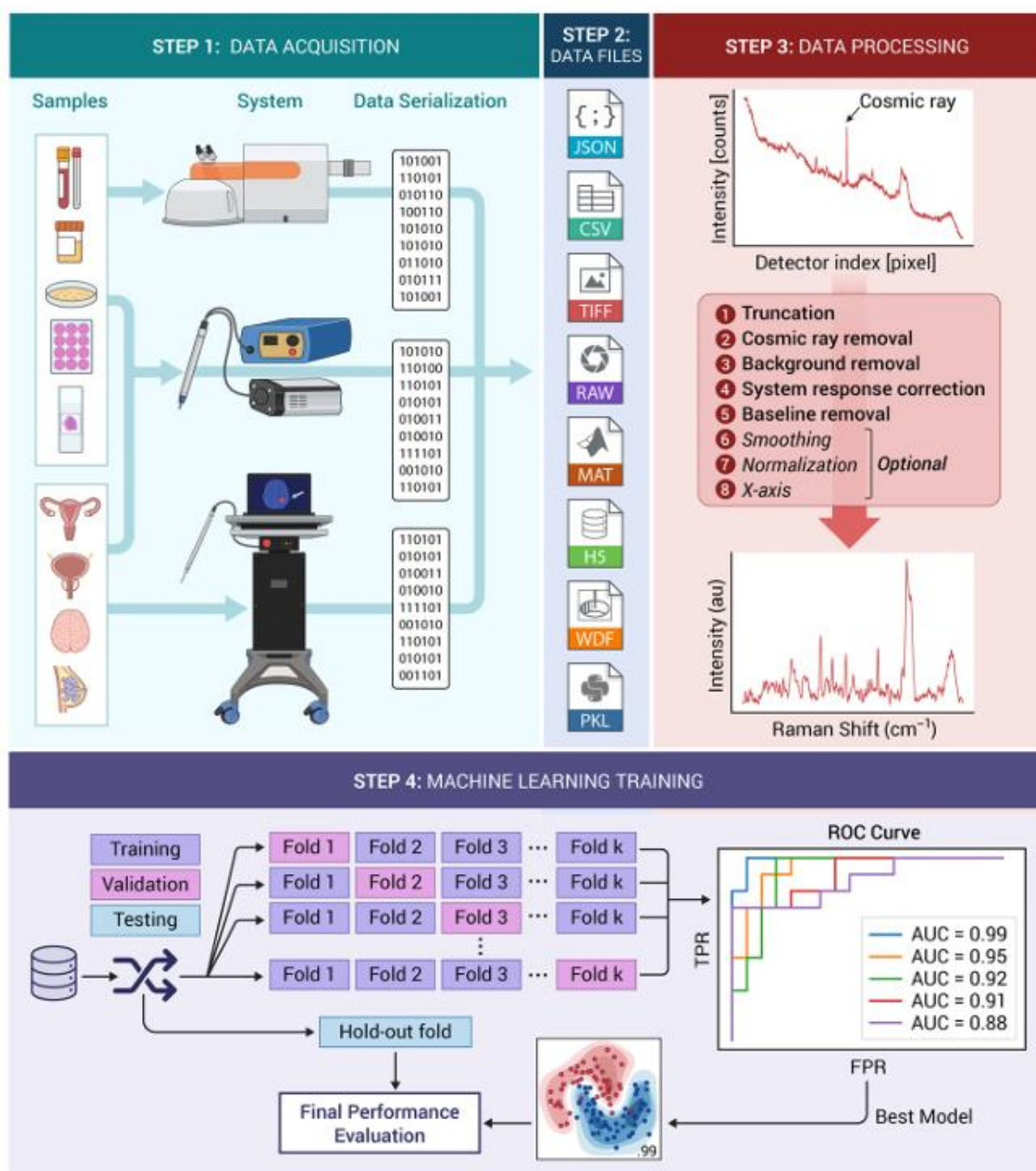


Figure 2.5 : Représentation schématique des étapes d'un protocole d'acquisition de données par spectroscopie Raman pour l'oncologie, et du développement de modèles prédictifs basés sur l'apprentissage automatique. (1) Acquisition des spectres Raman dans différents contextes biologiques. (2) Enregistrement des données dans des formats exploitables par des outils analytiques courants, comme Python. (3) Application d'algorithmes de prétraitement intégrés dans la chaîne de traitement ORPL. (4) Entraînement, validation et test de modèles d'apprentissage automatique, avec évaluation des performances au moyen d'analyses de courbes ROC (Receiver Operating Characteristic). Reproduite sous licence CC BY 4.0 ⁸²

Sur le plan clinique, le développement de sondes fibrées a permis l'application *in vivo* de la spectroscopie Raman, notamment en contexte endoscopique ou peropératoire. Des applications ont été rapportées dans plusieurs types de cancers⁸³⁻⁸⁸. L'interprétation des spectres, rendue complexe par la redondance et la variabilité des signaux biologiques, repose désormais majoritairement sur des approches statistiques et d'apprentissage automatique (par exemple SAM, PCA ou SVM), permettant d'exploiter l'information multidimensionnelle des données et d'atteindre des performances diagnostiques élevées⁸⁹⁻⁹¹. La Figure 2.5 présente les étapes principales d'un protocole d'acquisitions spectrales dans un contexte clinique.

Ainsi, la spectroscopie Raman permet d'accéder à une information biochimique intrinsèque, sans marquage et potentiellement en temps réel, ce qui en fait une modalité particulièrement adaptée à l'analyse de tissus complexes en oncologie, notamment dans des contextes où une évaluation rapide, localisée et non destructive est requise.

2.3.3 Cadre de travail et calibration

Au-delà des principes physiques de la spectroscopie Raman, la qualité et l'interprétabilité des données reposent fortement sur la calibration instrumentale et les étapes de traitement du signal, qui constituent des éléments critiques du cadre expérimental.

L'étalonnage en nombre d'onde est généralement réalisé à l'aide de standards tels que le silicium cristallin, le nylon, le Tylenol ou des matériaux de référence certifiés comme le Standard Reference Material (SRM) 2242a du NIST. Ces références sont utilisées pour corriger la position spectrale et l'intensité relative des spectres Raman, assurant la comparabilité entre instruments et au cours du temps. En combinant, par exemple, le SRM-2242a et le Tylenol, il est possible de calibrer respectivement l'axe des intensités (Y) et celui du décalage spectral (X)^{82,92}. Leur stabilité dans le temps permet de corriger les dérives instrumentales liées à l'utilisation ou au désalignement optique.

Toutefois, des études inter-laboratoires montrent que la calibration basée uniquement sur des pics peut introduire des incertitudes dépendantes de l'instrument et du protocole, nécessitant des procédures complémentaires et un contrôle rigoureux du rapport signal-bruit, notamment via des normalisations telles que la SNV⁹³. En parallèle, plusieurs algorithmes de traitement du signal sont utilisés pour corriger le fond et mettre en valeur les bandes Raman, incluant notamment les approches « *rolling ball* », « *bubblefill* », « *MorphBR* » ou « *IModPoly* »⁸².

Ainsi, la performance d'une plateforme Raman appliquée à l'oncologie dépend autant de la configuration optique et géométrique que de la maîtrise des paramètres expérimentaux et analytiques, ces choix conditionnant directement la sensibilité, la profondeur d'analyse et la fiabilité des signatures biochimiques obtenues.

2.3.4 Limites de la spectroscopie Raman

Malgré son potentiel en analyse tissulaire, la spectroscopie Raman présente plusieurs limites intrinsèques. La section efficace de diffusion étant extrêmement faible, le signal mesuré est limité, imposant des temps d'intégration plus longs ou des puissances laser plus élevées, ce qui peut restreindre le débit d'acquisition et induire un risque d'échauffement local dans des échantillons biologiques sensibles.

L'autofluorescence constitue également une source majeure de bruit, en particulier aux courtes longueurs d'onde. Bien que l'utilisation du proche infrarouge permette de la réduire, elle demeure un facteur limitant. De plus, les matériaux présents dans le trajet optique (substrats, fibres, polymères) peuvent générer des contributions spectrales parasites si la configuration expérimentale n'est pas rigoureusement contrôlée, rendant l'interprétation plus complexe.

La profondeur d'interrogation est par ailleurs limitée par la diffusion et l'absorption dans les tissus, restreignant l'analyse à des volumes superficiels en configuration conventionnelle. Cette contrainte est toutefois atténuée en conditions *ex vivo* microfluidiques, où l'épaisseur de l'échantillon est contrôlée.

Enfin, les approches Raman actuelles sont majoritairement optimisées soit pour des mesures *in vivo* à grande échelle, soit pour des analyses *ex vivo* sur tissus fixés. Elles restent donc peu adaptées à des plateformes microfluidiques nécessitant des mesures fonctionnelles, longitudinales et non destructives, soulignant le besoin d'adapter ces approches à ce contexte expérimental.

Tableau 2.1 : Résumé des avantages et limites de chaque approche en oncologie.

Domaine	Stratification des patients	Traitement personnalisé	Représentation de l'hétérogénéité tumorale	Dépendance aux marqueurs exogènes/endogènes	Débit d'analyse élevé
Oncologie de précision	✓	✓	✗	✓	✗
Microfluidique pour l'oncologie	✓	✓	✓	✓	✗
Optique pour l'oncologie	✓	≈	≈	✗	✓

2.3.5 Méthodes optiques et spectroscopie Raman en microfluidique

L'intégration des méthodes optiques aux plateformes microfluidiques permet d'envisager l'analyse de systèmes biologiques dans des environnements contrôlés, avec des lectures non destructives et potentiellement en temps réel. En oncologie, cette approche ouvre la voie à l'étude de tissus tumoraux *ex vivo* dans des conditions dynamiques, en combinant contrôle du microenvironnement et caractérisation optique.

Les modalités optiques les plus couramment intégrées en microfluidique incluent des approches morphologiques (microscopie en transmission, holographique) et des techniques basées sur la fluorescence, largement utilisées dans les systèmes *organ-on-chip*. Toutefois, ces approches présentent des limitations récurrentes, notamment une profondeur d'imagerie restreinte, la phototoxicité, le photoblanchiment et une dépendance à des marquages exogènes, limitant leur application à des analyses fonctionnelles longitudinales sur tissus vivants⁹⁴⁻⁹⁸.

Dans ce contexte, la spectroscopie Raman constitue une alternative attractive en raison de sa capacité à fournir une information biochimique intrinsèque sans marquage. Son intégration en microfluidique est bien documentée sur le plan technologique, avec des applications incluant la cytométrie Raman, l'analyse à cellule unique ou les systèmes en microgouttes^{99,100}. Toutefois, ces travaux concernent majoritairement des cellules dissociées, des systèmes simplifiés ou des modèles reconstruits, souvent analysés de manière ponctuelle.

Dans les systèmes *organ-on-chip*, certaines études ont intégré la spectroscopie Raman pour le suivi de modèles épithéliaux ou de microtissus^{97,101}. Néanmoins, ces modèles ne reproduisent pas

pleinement l'architecture et l'hétérogénéité des tissus tumoraux humains primaires, et les approches restent majoritairement limitées à des mesures statiques et fixées, sans suivi longitudinal.

Par ailleurs, l'intégration Raman en microfluidique soulève plusieurs défis techniques, notamment liés à la faible section efficace de diffusion, aux interférences de fluorescence et aux contributions spectrales des matériaux microfluidiques (PDMS, polymères, verre), qui peuvent altérer le signal d'intérêt^{100,102}. La corrélation spatiale entre mesures Raman et validation histopathologique demeure également rarement documentée dans ces systèmes^{103,104}.

L'analyse de la littérature met en évidence un décalage entre des domaines pourtant complémentaires. D'une part, la spectroscopie Raman appliquée à des tissus tumoraux *ex vivo* avec validation histopathologique est bien établie^{72,105,106}. D'autre part, les plateformes microfluidiques permettant le maintien et la perfusion de tissus tumoraux viables sont également en développement actif^{107,108}. Cependant, l'intégration simultanée de ces deux approches (c'est-à-dire l'analyse Raman de tissus tumoraux humains primaires maintenus sous perfusion microfluidique, avec corrélation spatiale rigoureuse à l'histopathologie) apparaît absente dans la littérature examinée^{72,97,103,104,109,110}.

Ainsi, malgré la maturité individuelle de ces technologies, leur convergence reste peu explorée. Cette lacune suggère l'existence d'un espace méthodologique pour le développement de plateformes intégrées combinant maintien de l'architecture tumorale, lecture biochimique sans marquage et validation histopathologique, en particulier dans une perspective d'analyse fonctionnelle et d'oncologie de précision.

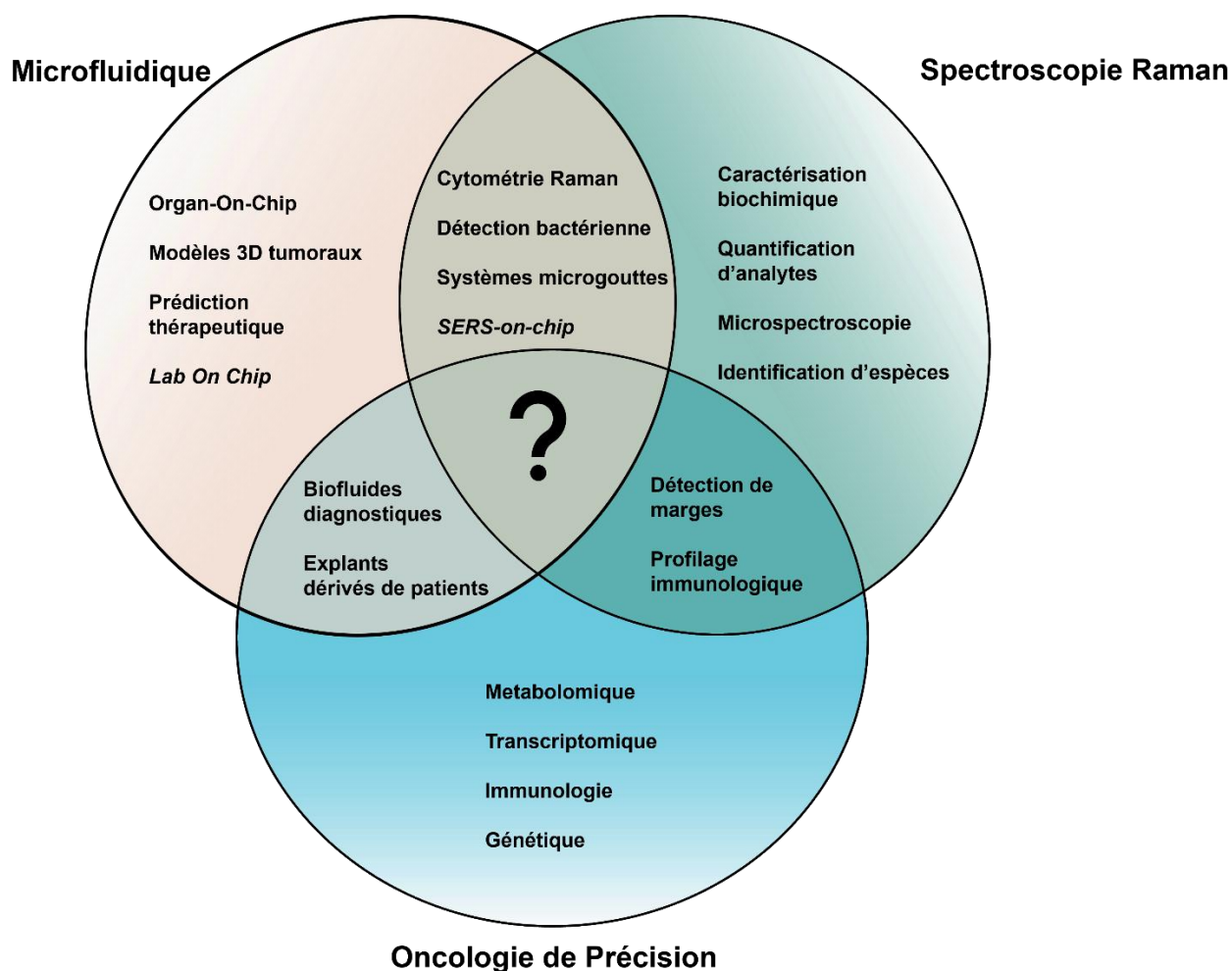


Figure 2.6 : Paysage non exhaustif des applications typiques de chacun des domaines concernés, axes de synergies et lacune d'un espace méthodologique liant les trois domaines.

2.4 Raman et pathologie : fondements statistiques des approches appariées et non appariées

Une limite fondamentale des approches histopathologiques classiques réside dans leur caractère destructif, comme nous l'avons déjà établis. Chaque analyse étant terminale, il devient impossible de mesurer un même échantillon avant et après traitement. Les comparaisons reposent alors sur des groupes indépendants, ce qui introduit une variabilité interindividuelle importante, particulièrement marquée dans les tissus tumoraux.

À l'inverse, une approche non destructive comme la spectroscopie Raman permet, en principe, de suivre un même explant au cours du temps. Cette différence expérimentale entraîne une

conséquence directe sur le plan statistique : elle permet de passer d'un test non apparié à un test apparié, où chaque échantillon devient son propre contrôle.

L'auteur développe ici les mathématiques montrant comment un changement dans ce type de tests affecte l'échantillonnage requis pour conclure sur des résultats statistiques. Considérons une population non traitée de moyenne μ_1 et d'écart-type σ_1 , et une population traitée de moyenne μ_2 et d'écart-type σ_2 . L'effet du traitement correspond à la différence des moyennes mesurée dans les deux populations, soit défini comme :

$$\Delta = \mu_1 - \mu_2 \quad (1)$$

2.4.1 Comparaison non appariée

Dans le cas destructif (histopathologie), la comparaison se fait entre deux groupes indépendants.

La variance de la différence de moyennes, pour n sujets par groupe, est :

$$\text{Var}(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) = \frac{\sigma_1^2}{n} + \frac{\sigma_2^2}{n} \quad (2)$$

Où X_1 est la mesure du groupe 1, et X_2 la mesure du groupe 2. En supposant $\sigma_1 = \sigma_2 = \sigma$, si nous assumons que la dispersion des mesures est la même dans les deux groupes :

$$\text{Var}(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) = \frac{2\sigma^2}{n} \quad (3)$$

Cette variance inclut l'ensemble de la variabilité biologique entre échantillons, incluant l'hétérogénéité inter-patient et inter-tissu.

2.4.2 Comparaison appariée

Dans le cas non destructif (Raman), on peut mesurer chaque échantillon avant et après traitement.

On définit alors une différence sur l'échantillon lui-même:

$$D_i = Y_i - X_i \quad (4)$$

Où Y_i est la mesure après l'expérience, et X_i avant l'expérience. La variance des différences n'est pas indépendante, et est donnée par :

$$\text{Var}(D) = \frac{\sigma_1^2}{n} + \frac{\sigma_2^2}{n} - \frac{2\rho\sigma_1\sigma_2}{n} \quad (5)$$

où ρ représente la corrélation entre les mesures avant et après traitement pour un même échantillon (allant de -1 à 1). En supposant $\sigma_1 = \sigma_2 = \sigma$ encore, on obtient :

$$\text{Var}(D) = \frac{2\sigma^2(1 - \rho)}{n} \quad (6)$$

Ainsi, une partie de la variabilité interindividuelle est éliminée. Plus la corrélation intra-échantillon est élevée, plus la variance diminue.

Dans le cas où les variances seraient différentes, le terme négatif de $\text{Var}(D)$ ne fait que diminuer cette dernière et garde la véridicité du résultat.

2.4.3 Conséquence sur la taille d'échantillonnage

Si l'on suppose que les estimations de moyenne suivent une distribution approximativement gaussienne, ce qui est justifié par le théorème central limite lorsque le nombre de MDTs par condition est suffisant, il est possible d'utiliser les expressions analytiques classiques pour l'estimation de la taille d'échantillon. La taille d'échantillon nécessaire pour détecter un effet Δ , pour un niveau de signification α et une puissance $1 - \beta$, est donc proportionnelle à la variance du test. Dans le cas non apparié:

$$N_{\text{non apparié}} = \frac{4(z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})^2 \sigma^2}{\Delta^2} \quad (7)$$

Dans le cas apparié:

$$N_{\text{apparié}} = \frac{2(z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})^2 \sigma^2 (1 - \rho)}{\Delta^2} \quad (8)$$

Le rapport entre (7) et (8) est donc :

$$\frac{N_{\text{non apparié}}}{N_{\text{apparié}}} = \frac{2}{1 - \rho} \quad (9)$$

Même pour des valeurs modérées de corrélation, le gain est significatif. Par exemple, pour $\rho = 0.5$ (corrélation modérée), une approche appariée nécessite environ quatre fois moins de sujets.

Application numérique:

Considérons un effet modéré $\Delta = 0.5\sigma$, avec $\alpha = 0.05$ et une puissance de 80 % ($z_{1-\alpha/2} = 1.96$, $z_{1-\beta} = 0.84$, valeurs issues d'une table de loi normale centrée réduite). En utilisant le ratio tout juste défini, l'approche non appariée donne $N = 126$ échantillons contre $N=32$ pour l'approche appariée. Cette réduction d'un facteur 4 illustre directement l'impact de la suppression de la variance interindividuelle. Refaire ce calcul pour des corrélations différentes donne environ 2 fois moins de sujets si $\rho = 0$, environ 3 fois moins de sujets si $\rho = 0.33$, et environ 5 fois moins de sujets si $\rho = 0.6$. Même dans le cas le plus aléatoire possible, soit une corrélation de 0, l'approche appariée requiert deux fois moins d'échantillons pour la même conclusion statistique.

2.4.4 Implication pour l'analyse des explants tumoraux

Dans le contexte des explants tumoraux, l'hétérogénéité intrinsèque des tissus constitue une source majeure de variance. Les approches destructives imposent une comparaison entre échantillons distincts, amplifiant davantage cette variabilité. À l'inverse, une approche non destructive permet de suivre un même microenvironnement tissulaire au cours du temps, ce qui réduit la variance interindividuelle et améliore la puissance statistique.

Cet avantage repose sur la corrélation intra-échantillon entre les mesures répétées. Lorsque cette corrélation est élevée, comme attendu pour des acquisitions répétées sur un même explant dans des conditions contrôlées, la réduction de variance devient significative. En pratique, cette condition est généralement satisfaite dans les systèmes biologiques, où les mesures sont réalisées sur une même structure tissulaire, dans un environnement stabilisé et avec une variabilité instrumentale limitée. La cohérence spatiale et biologique du signal mesuré favorise ainsi une corrélation intra-échantillon élevée. À l'inverse, si la corrélation est fortement dégradée, notamment en présence d'un bruit expérimental dominant ou d'une instabilité de mesure, le gain associé à l'appariement diminue. Toutefois, ces situations correspondent davantage à des limitations expérimentales qu'à des contraintes intrinsèques de l'approche. Une corrélation intra-échantillon faible ou négative ne réfute pas l'effet que l'on souhaite mesurer, mais en masque la détection en augmentant la variance du test.

Ainsi, l'intérêt des approches non destructives comme la spectroscopie Raman en contexte optofluidique repose non seulement sur leur caractère non invasif, rapide et représentatif, mais également sur leur capacité à exploiter des mesures appariées dans des conditions où la cohérence

intra-échantillon est naturellement préservée. Dans un contexte clinique, où les sujets sont des patients et les enjeux des études précliniques et cliniques sont élevés, une économie de patients ou un renforcement du niveau de confiance est un avantage direct et mesurable sur les plans humains, éthiques et économiques.

CHAPITRE 3 OBJECTIFS DE RECHERCHE

Les applications de la spectroscopie Raman en microfluidique demeurent largement inexplorées. Or, comme discuté précédemment, les approches actuelles d'analyse des tissus tumoraux reposent principalement sur des méthodes destructives, ce qui limite à la fois la sélection des explants et l'étude longitudinale des réponses biologiques. Dans ce contexte, l'hypothèse centrale de ce travail est que l'intégration de la spectroscopie Raman au sein d'une plateforme optofluidique permettant le maintien d'explants tumoraux viables pourrait offrir une lecture biochimique intrinsèque et non destructive des dynamiques cellulaires et des réponses thérapeutiques à l'échelle tissulaire, tout en préservant l'architecture et les interactions du microenvironnement tumoral. Afin d'explorer cette hypothèse, ce travail s'articule autour des objectifs suivants :

Objectif général: développer et valider une plateforme optofluidique intégrée combinant microfluidique et spectroscopie Raman pour l'étude longitudinale d'explants tumoraux vivants. Cette plateforme doit permettre l'acquisition de données spectrales sur des explants viables, ainsi que la corrélation des mesures spectrales et pathologiques.

- Sous-objectif 1 : concevoir et développer l'infrastructure expérimentale nécessaire à l'intégration de la spectroscopie Raman avec une plateforme microfluidique dédiée à la manipulation d'explants tumoraux, incluant la conception et l'intégration des composantes matérielles et logicielles.
- Sous-objectif 2 : valider l'utilisation de la spectroscopie Raman pour identifier le contenu tissulaire des explants tumoraux (en tranches puis en MDT) et en permettre le tri non destructif de ces derniers.
- Sous-objectif 3 : Appliquer cette méthodologie à l'étude des réponses cellulaires et tissulaires induites par des perturbations pharmacologiques. Évaluer dans quelle mesure les signatures spectrales obtenues par spectroscopie Raman reflètent des dynamiques biologiques pertinentes.

Le reste de ce mémoire est structuré en quatre chapitres expérimentaux. Le chapitre 4 présente le développement de la plateforme d'acquisition Raman et son adaptation aux deux configurations utilisées, soit la plaque à puits et la puce microfluidique. Le chapitre 5 porte sur l'identification du contenu tissulaire à partir de tranches de tissus. Le chapitre 6 décrit la conception d'une puce

microfluidique compatible avec les contraintes de la spectroscopie Raman. Enfin, le chapitre 7 explore les dynamiques de destin cellulaire au sein d'explants tumoraux à l'aide de cette approche.

CHAPITRE 4 DÉVELOPPEMENT D'UNE PLATEFORME OPTOFLUIDIQUE INTÉGRÉE POUR LE SUIVI LONGITUDINAL D'EXPLANTS TUMORAUX

4.1 Contexte scientifique et technique

Le LumedLab, dirigé par le Prof. Leblond, s'est établi dans la communauté scientifique comme un développeur de systèmes Raman performants ayant démontré leur potentiel d'utilisation intra-opératoire dans plusieurs études portant sur différents types de cancers^{83,111–113}. Ces divers systèmes sont regroupés sous l'appellation Lumed Raman Platform (LRP). Les plateformes se composent d'un système optique (Lumed Raman System, LRS), d'un logiciel d'acquisition à accès-libre nommé Open-source Raman Acquisition Software (ORAS) et d'un environnement de traitement des données nommé Open-source Raman Processing Library (ORPL), également à accès-libre¹¹⁴. En pratique, ces systèmes ont été conçus et optimisés pour un déploiement en salle d'opération. Leur architecture matérielle et logicielle repose donc sur les contraintes du contexte clinique, notamment la rapidité d'acquisition, la manipulation directe par le chirurgien et l'intégration aux équipements médicaux disponibles au bloc opératoire. Chaque étude implique également une optimisation des paramètres physiques et logiciels en fonction du type de cancer étudié, à nouveau dans un contexte clinique.

Cependant, cette architecture n'est pas directement transposable aux contraintes expérimentales associées aux systèmes microfluidiques et aux modèles précliniques. En particulier, les acquisitions réalisées avec les plateformes LRP reposent sur un positionnement manuel de la sonde Raman. Une telle approche devient impraticable lorsque les échantillons à analyser sont des dizaines de MDTs d'environ 350 μm de diamètre. Le positionnement manuel précis de la sonde au-dessus de ces structures et la répétition de dizaines d'acquisitions successives sur un même support, s'avèrent peu efficaces et difficilement reproductibles.

Inversement, les dispositifs actuellement utilisés en recherche biologique présentent également des limites pour les applications de diagnostic optique. De nombreux dispositifs sont notamment fabriqués en PDMS ou en plastique, des matériaux largement utilisés en microfluidique, mais qui

présentent une signature Raman intrinsèque susceptible d'interférer avec les régions spectrales nécessaires à l'analyse de tissus tumoraux, comme illustré aux Figures 4.1 et 5.2.

Dans ce contexte, le présent chapitre décrit le travail de conception, d'adaptation et d'optimisation réalisé afin de faire converger les mesures Raman sur des tranches de tissu avec une plaque en aluminium et sur des MDTs avec une plateforme microfluidique. Ces deux véhicules représentent les supports qui seront utilisés dans ce projet pour les différentes acquisitions, et ils seront détaillés aux chapitres associés. L'objectif de ce chapitre est de développer une plateforme d'acquisition spectrale intégrée permettant la mesure automatisée de spectres Raman sur les deux dispositifs qui seront utilisés.

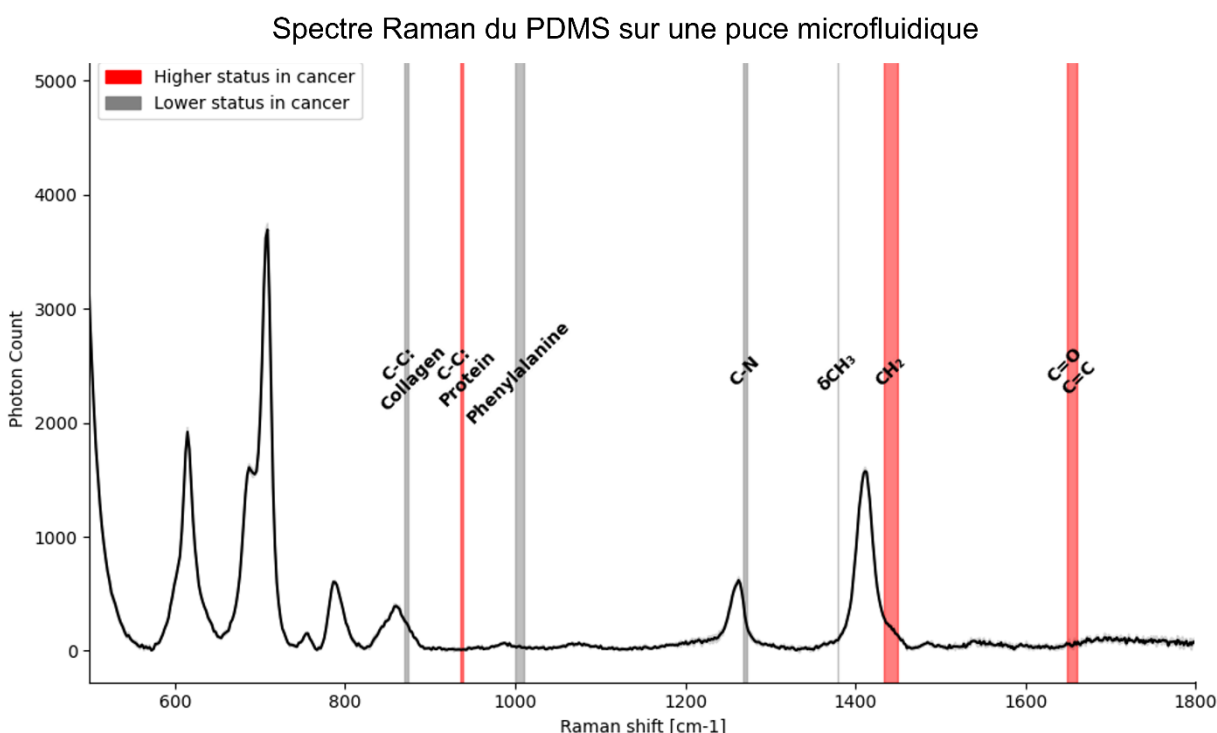


Figure 4.1 : Spectre Raman du PDMS acquis sur une puce microfluidique. En rouge, les régions spectrales nécessaires pour mesurer un échantillon tumoral. En gris, les régions spectrales variant en fonction du diagnostic et du type de cancer.

4.2 Le Lumed Raman Scanner

Un système Raman complet typique est illustré à la Figure 4.2a¹¹⁴. Le système se compose d'une sonde Raman connectée à une source laser IPS, d'un spectromètre à réseau de diffraction et d'un

module de contrôle électronique basé sur un microcontrôleur Arduino qui mène à la caméra Andor. L'ensemble des modules est piloté par un ordinateur exécutant le logiciel d'acquisition ORAS.

Afin d'adapter ce système à l'analyse d'échantillons microfluidiques, un outil de translation motorisé a été développé pour permettre le positionnement automatisé de la sonde Raman au-dessus des puits d'une puce microfluidique. Ce dispositif repose sur la modification d'une imprimante 3D Original Prusa MINI+ (Prusa Research, Prague, Czech Republic). La tête d'impression a été retirée et remplacée par un support mécanique permettant de fixer la sonde Raman à l'extrémité du système de translation.

Le système de translation de l'imprimante, basé sur des axes motorisés contrôlés par G-code, permet un déplacement précis de la sonde selon les axes X, Y et Z. Le G-code est le langage de commandes compris par l'imprimante 3D, pour Géometric-Code. Dans cette configuration, la résolution minimale de déplacement est de 100 μm , ce qui est suffisant pour positionner la sonde au-dessus des positions d'intérêts des deux véhicules, respectivement à 2 et 9 mm de distance.

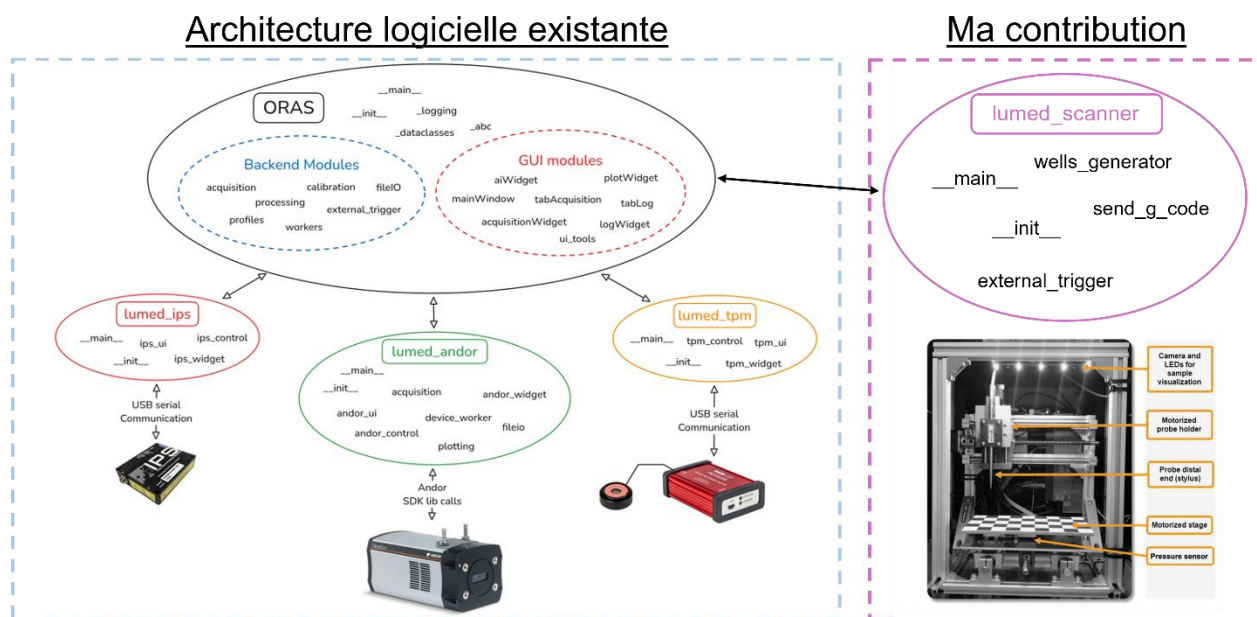


Figure 4.2 : (A) Vue d'ensemble de l'architecture logicielle des plateformes Lumed Raman, illustrant l'aspect modulaire de la conception¹¹⁴. (B) Contribution de ce travail, le module lumed_scanner qui permet de contrôler de façon externe le scanner présenté en (C).

La configuration finale du scanner Raman est présentée à la Figure 4.2c, où les principales composantes du système sont annotées. Cette adaptation permet de transformer une plateforme Raman initialement conçue pour des acquisitions manuelles en un système automatisé capable d'effectuer des acquisitions répétées sur des dispositifs contenant plusieurs échantillons.

Pris tout ensemble, l'approche générale est la suivante : lorsque les échantillons sont préparés à la taille désirée, ils sont placés sur le véhicule correspondant. Le véhicule est mis dans le scanner, puis une séquence d'acquisition est lancée où chaque puits est visité une fois par la sonde, qui mesure un volume approximatif de 300 microns de profondeur par 300 microns carrés d'aire de coupe. Les composantes, leurs mouvements et leurs fonctions sont décrites dans les sections suivantes.

4.3 Sonde adaptée à des explants miniaturisés : Collaboration industrielle 1

Les sondes Raman utilisées dans les plateformes Lumed Raman Platform ont initialement été conçues pour des applications cliniques intra-opératoires, où les mesures sont réalisées directement au contact de tissus macroscopiques dans leur environnement natif. Dans ce contexte, la géométrie optique de la sonde est optimisée pour des acquisitions en contact ou à très courte distance de l'échantillon.

Cette configuration devient cependant inadaptée pour l'analyse d'échantillons microdisséqués tels que les MDTs et les tranches utilisés dans ce projet. Ces derniers sont placés au fond de puits remplis de milieu de culture. Dans cette configuration, une sonde conçue pour un contact direct avec l'échantillon présente plusieurs limites. Premièrement, le contact mécanique entre la sonde et l'explant peut entraîner une déformation ou un écrasement du tissu, compromettant la viabilité de l'échantillon et la reproductibilité des mesures. Deuxièmement, la présence d'un liquide entre la sonde et l'échantillon peut entraîner la formation d'un pont capillaire entre les deux surfaces, générant des forces d'adhésion susceptibles de faire adhérer temporairement l'explant à la sonde lors de son retrait¹¹⁵. Ceci peut déplacer l'échantillon à l'intérieur du puits microfluidique ou d'une séquence d'acquisitions, et donc impacter négativement la qualité de la mesure.

Afin de répondre à ces contraintes, une sonde Raman modifiée a été développée en collaboration avec la compagnie EMVision (Californie, USA), qui fabrique les sondes utilisées dans les systèmes

Raman du laboratoire LumedLab. La principale modification concerne la géométrie optique de la sonde, et plus particulièrement la position du plan focal.

En effet, dans la configuration standard, le plan focal est situé très près de l'extrémité de la sonde afin de permettre des mesures en contact avec le tissu. Dans la sonde développée dans le cadre de ce travail, le plan focal a été déplacé à 500 μm de l'extrémité de la sonde. Cette modification permet d'effectuer les acquisitions Raman à distance du tissu, tout en conservant un signal suffisant pour l'analyse spectrale. Cette distance de travail supplémentaire permet également de focaliser le faisceau au niveau des tissus étudiés, tout en évitant tout contact direct entre la sonde et l'échantillon.

La Figure 4.3 présente une comparaison par tracé de rayon entre la géométrie optique de la sonde standard et celle développée dans ce travail. Cette modification permet d'adapter l'instrumentation Raman aux contraintes expérimentales associées à l'analyse de tranches et micro-explants tumoraux sur les différents dispositifs.

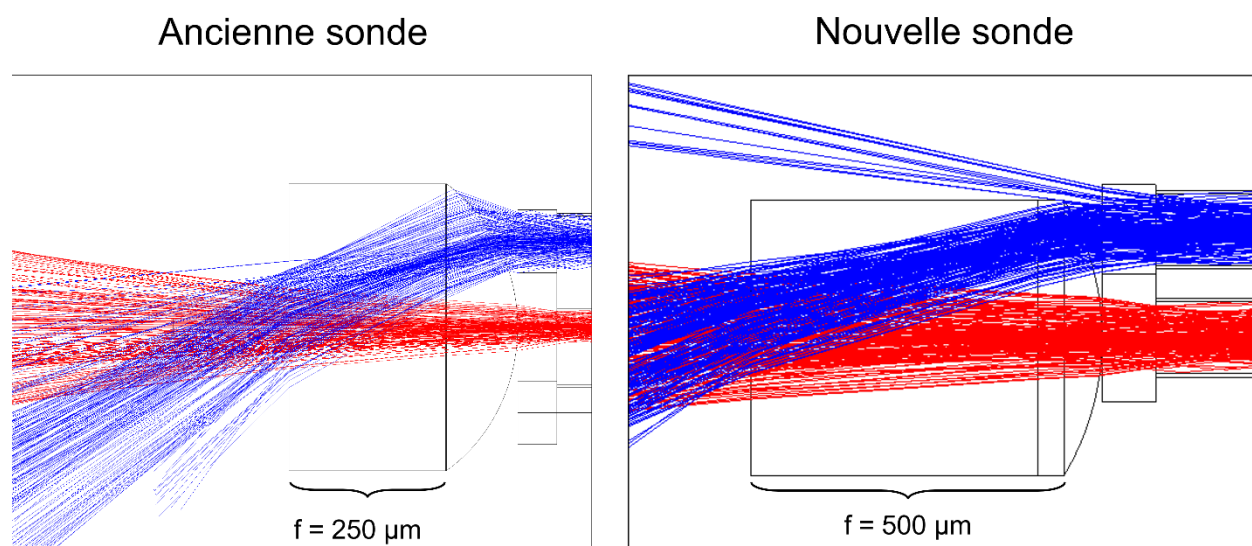


Figure 4.3 : Tracé de rayons pour le modèle original de la sonde Raman (A) et pour la nouvelle sonde développée par EMVision (B). Les tracés rouges sont les rayons incidents (longueur d'onde d'excitation) et les tracés bleus sont les rayons réfractés (longueur d'onde décalée). Les graphes sont produits par depuis Zeemax par Eric Marple, EMVision.

4.4 Montage expérimental complet

La Figure 4.4 présente l'assemblage complet de la plateforme expérimentale développée dans ce travail. Le système intègre l'instrumentation Raman du LumedLab, le scanner motorisé permettant le positionnement automatisé de la sonde ainsi que l'infrastructure logicielle nécessaire au contrôle de l'ensemble.

Le système Raman Lumed constitue le cœur de l'instrumentation spectroscopique. Il comprend la source laser, la caméra, le spectromètre et l'électronique de contrôle nécessaires à l'acquisition des spectres Raman. Ce système est piloté par un ordinateur exécutant le logiciel ORAS, responsable du contrôle de l'instrument et du déclenchement des acquisitions spectrales.

Le positionnement de la sonde Raman est assuré par un stage motorisé dérivé d'une imprimante 3D, dans lequel la sonde remplace la tête d'impression. Ce système permet de positionner automatiquement le point d'excitation au-dessus des coordonnées contenant les échantillons tumoraux. Les échantillons sont organisés dans un véhicule comme une plaque à puits en aluminium ou une plateforme microfluidique en PDMS.

Le contrôle du scanner et de la séquence expérimentale est assuré par le logiciel LOCARS. LOCARS coordonne les déplacements du stage motorisé, la sélection des positions à analyser et la synchronisation avec ORAS pour le déclenchement des acquisitions Raman. Lorsqu'une position

cible est atteinte, un signal de déclenchement est transmis à ORAS afin d'initier l'acquisition spectrale correspondante.

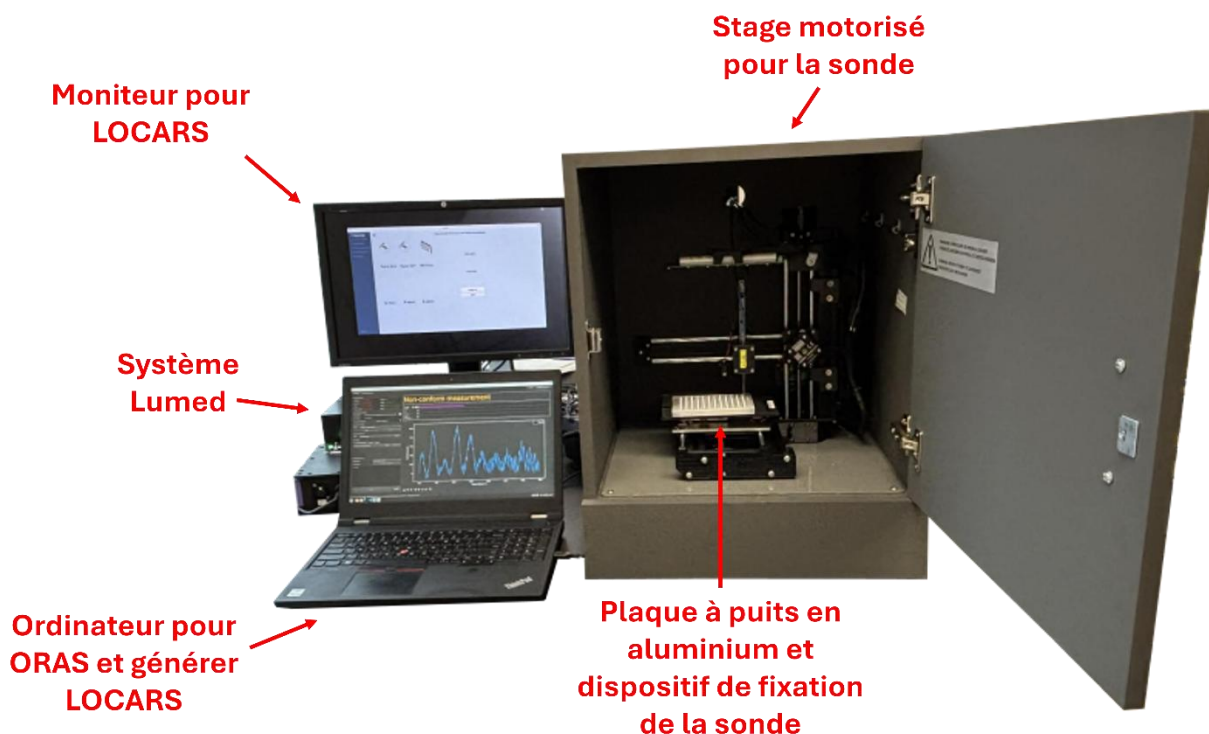


Figure 4.4 : Montage expérimental complet de la plateforme optofluidique Raman développée dans ce travail. Le système comprend le spectromètre Raman Lumed piloté par le logiciel ORAS, un scanner motorisé permettant le positionnement automatisé de la sonde Raman au-dessus des échantillons et une plaque à puits en aluminium conçue pour minimiser le signal de fond Raman. Le logiciel LOCARS contrôle le déplacement du scanner et la séquence expérimentale, permettant l'acquisition automatisée de spectres Raman sur plusieurs explants tumoraux.

L'ensemble forme une plateforme optofluidique automatisée permettant l'acquisition séquentielle de spectres Raman sur plusieurs échantillons sans intervention manuelle entre les mesures. Malgré l'intégration d'un système de translation motorisé et d'un dispositif dédié, l'empreinte physique de la plateforme demeure comparable à celle d'un microspectromètre Raman de laboratoire standard. Ce volume occupé facilite son utilisation dans un environnement de recherche préclinique tout en conservant les fonctionnalités nécessaires à l'étude longitudinale d'explants tumoraux.

4.5 Logiciel Optofluidique de Contrôle pour l'Acquisition par Raman Spectroscopy

Afin d'intégrer l'équipement Raman, la plateforme microfluidique ainsi que le système de translation motorisé dans un cadre expérimental automatisé, une interface logicielle dédiée a été

développée pour contrôler l'ensemble du scanner. Cette interface devait répondre à plusieurs contraintes techniques. Elle devait fonctionner sous Linux, rester compatible avec les bibliothèques et logiciels utilisés au laboratoire (ORAS et ORPL) et permettre une communication en temps réel avec les scripts d'acquisition afin de coordonner les déplacements de la sonde avec les temps d'intégration nécessaires à l'acquisition des spectres Raman.

Dans ce contexte, une interface graphique nommée Logiciel Optofluidique de Contrôle pour l'Acquisition par Raman Spectroscopy (LOCARS) a été développée. LOCARS agit comme une couche de contrôle externe permettant de coordonner les déplacements du scanner et le déclenchement des acquisitions Raman sur des dispositifs contenant plusieurs échantillons.

Le logiciel a été développé en Python et conçu de manière modulaire afin de rester compatible avec l'architecture logicielle existante du laboratoire. En particulier, LOCARS peut communiquer avec ORAS pour déclencher des acquisitions spectrales tout en contrôlant de manière indépendante le système de translation motorisé. Cette séparation des fonctions permet de conserver l'infrastructure logicielle existante tout en ajoutant les fonctionnalités nécessaires à l'automatisation des expériences microfluidiques.

Les sections suivantes présentent l'architecture de communication entre les différents modules logiciels, ainsi que les principales fonctions développées pour automatiser le positionnement de la sonde et l'acquisition de spectres Raman sur les coordonnées des dispositifs.

LOCARS a été implémenté sous la forme d'un module logiciel nommé *lumed_scanner*, permettant d'assurer le contrôle du scanner Raman tout en communiquant avec ORAS pour déclencher les acquisitions spectrales

L'ensemble du code source du logiciel LOCARS développé dans le cadre de ce travail est disponible publiquement sur le référentiel [GitHub](#) de l'auteur.

4.5.1 Le module LOCARS

L'ensemble des fonctions de contrôle développées dans ce travail ont été intégrées dans une interface graphique (GUI), comme mentionné précédemment, conçue à travers PyQt5. Cette interface vise à centraliser les différentes manipulations nécessaires à la préparation et à l'exécution

d'acquisitions automatisées, favorisant une utilisation simple et intuitive pour les opérateurs du laboratoire.

La Figure 4.5 présente l'interface principale du logiciel lors de son ouverture. L'architecture du GUI repose sur un menu latéral repliable permettant d'accéder aux différentes sections du logiciel, incluant la sélection du modèle de dispositif utilisé (plateforme microfluidique ou plaque à puits), le contrôle du système de translation, la calibration du système et la gestion des acquisitions.

Dans l'onglet de sélection du dispositif, l'utilisateur peut choisir parmi plusieurs modèles de dispositifs. Une fois un modèle sélectionné, la grille de coordonnées correspondante est générée automatiquement à partir du fichier de configuration associé. Cette grille permet de visualiser les positions disponibles sur le dispositif et de sélectionner les coordonnées à analyser.

Afin d'assurer la traçabilité des opérations et de faciliter le diagnostic en cas de problème, un système de journalisation a également été intégré au logiciel. Toutes les actions importantes ainsi que les messages générés par le programme sont enregistrés dans un fichier *log*. Cette fonctionnalité permet de retracer les événements survenus lors d'une acquisition et d'identifier plus facilement les sources d'erreurs éventuelles.

L'intégralité des différentes sections de l'interface ne sont pas illustrées davantage afin d'éviter d'alourdir le présent texte. Toutefois, des captures d'écran de tous les onglets sont disponibles en [Annexe B](#) pour illustrer chacun des onglets du logiciel, tandis que leurs principales fonctionnalités ont été décrites dans les sections suivantes de ce chapitre.

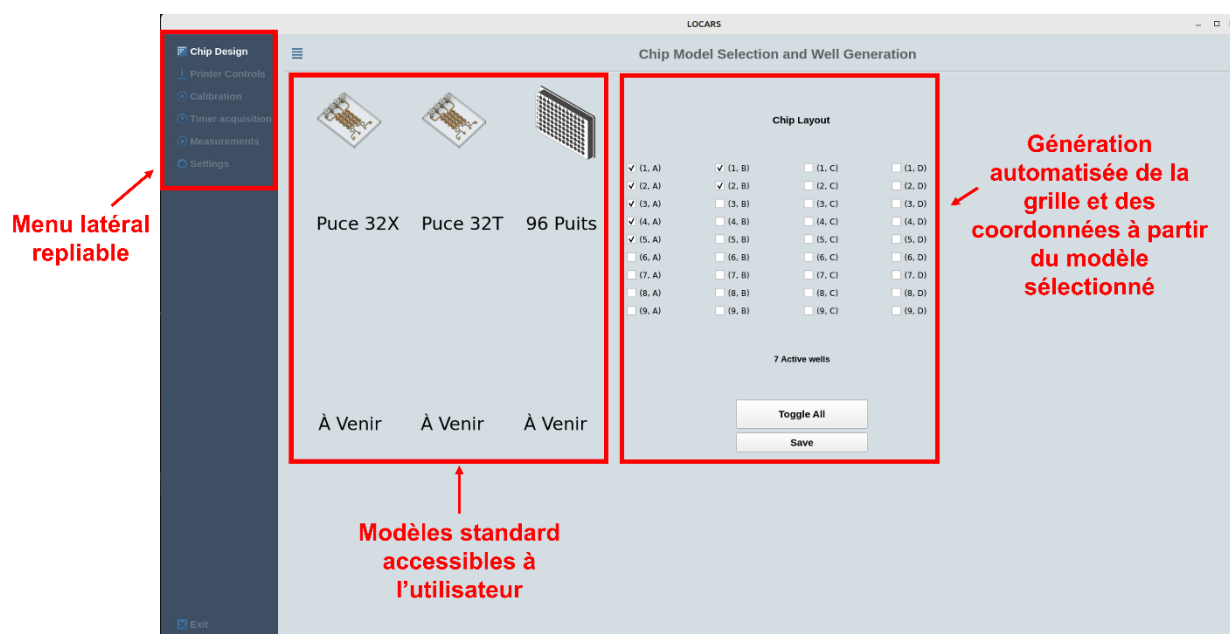


Figure 4.5 : Interface principale du logiciel LOCARS. Menu latéral repliable permettant d'accéder aux différentes sections du logiciel, sélection de modèles de dispositif et génération automatique de la grille de coordonnées associées, l'ensemble représentant le premier onglet de l'interface.

4.5.2 Communication, coordination des acquisitions et mouvement du scanner

LOCARS a été conçu afin d'automatiser la séquence d'acquisition. Pour permettre cette automatisation, une communication bidirectionnelle entre ORAS et LOCARS a été mise en place, avec l'aide de Guillaume Sheehy, PhD.

Dans cette architecture, ORAS demeure responsable de l'acquisition des spectres Raman, tandis que LOCARS contrôle le déplacement du scanner et la séquence expérimentale. Afin de coordonner ces deux systèmes, une fonction nommée *external_trigger* a été ajoutée à ORAS. Cette fonction agit comme un indicateur booléen permettant à ORAS de déclencher une acquisition Raman lorsqu'une position cible est atteinte par le scanner.

Cette approche permet de dissocier les responsabilités des deux logiciels. ORAS conserve la gestion du système Raman et du processus d'acquisition, tandis que LOCARS contrôle les déplacements du scanner et la logique expérimentale associée à l'acquisition sur le dispositif. Cette séparation permet également d'exécuter les deux logiciels sur des systèmes indépendants si

nécessaire. Les sous-sections suivantes présentent les principales fonctions développées dans le module *lumed_scanner*, ainsi que le schéma fonctionnel guidant leur implémentation.

4.5.2.1 Mouvement de la sonde

Comme mentionné précédemment, le positionnement de la sonde Raman repose sur un système de translation dérivé d'une imprimante 3D, dans lequel la sonde remplace la buse d'impression. Ces dispositifs sont contrôlés à l'aide du protocole standardisé G-code.

Afin d'intégrer ce contrôle dans l'environnement logiciel LOCARS, une fonction dédiée nommée *send_gcode* a été développée pour assurer la communication entre les scripts Python et le contrôleur du scanner. Le schéma fonctionnel de cette fonction est présenté à la Figure 4.6.

Cette fonction agit comme une interface simple permettant d'envoyer directement des commandes G-code via la connexion série. Lorsque la connexion est valide, la commande est transmise au contrôleur, suivie d'un court délai permettant son exécution. Une gestion d'erreur est également incluse afin de détecter les interruptions de communication.

Cette abstraction logicielle permet d'unifier les différentes modalités de contrôle du scanner dans l'interface LOCARS. Trois modes de contrôle sont implémentés:

- Mode manuel, accessible via l'interface graphique, permettant de déplacer la sonde par incréments prédéfinis le long des axes motorisés (onglet 2 de LOCARS)
- Mode commande directe, permettant à l'utilisateur d'envoyer des instructions G-code personnalisées via un champ de saisie dans l'interface (onglet 6 de LOCARS)
- Mode automatisé, dans lequel les déplacements du scanner sont générés automatiquement à partir de la géométrie du dispositif sélectionné (onglet 1 de LOCARS)

Grâce à cette architecture, l'ensemble des mouvements du scanner reposent sur une même fonction d'envoi de commandes G-code, tout en offrant différents niveaux de contrôle à l'utilisateur. Cette approche facilite l'intégration avec l'infrastructure logicielle existante du laboratoire tout en permettant l'automatisation des acquisitions.

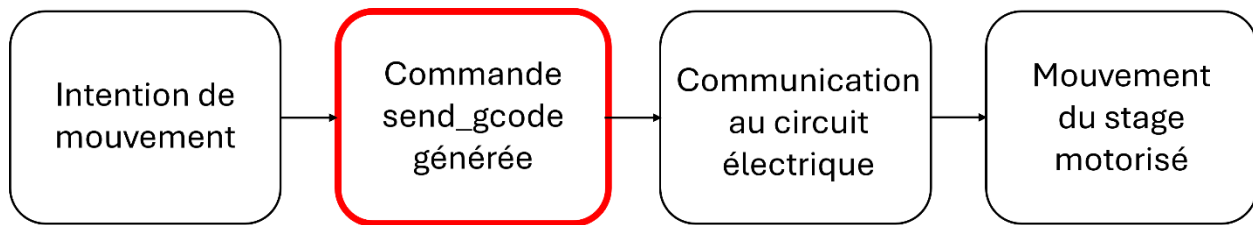


Figure 4.6 : Schéma fonctionnel illustrant l'intégration de la fonction *send_gcode* dans la chaîne de contrôle menant au déplacement du stage motorisé.

4.5.2.2 Grille de coordonnée

Afin d'automatiser le positionnement de la sonde Raman au-dessus des différentes coordonnées d'un dispositif, un ensemble de fonctions a été développé pour générer dynamiquement les coordonnées de chaque modèle à partir d'un fichier de configuration externe. L'objectif de cette architecture est double. Premièrement, réduire les manipulations manuelles nécessaires à l'opérateur lors de la préparation expérimentale. Deuxièmement, concevoir un système suffisamment flexible pour s'adapter à différents designs de dispositifs dans le futur sans modification du code source.

Les différentes géométries de dispositif sont décrites à l'aide de fichiers de configuration au format TOML (*Tom's Obvious, Minimal Language*; créé par Tom Preston-Werner). Chaque fichier contient les paramètres géométriques, incluant ses dimensions globales, le nombre de rangées et de colonnes ainsi que les coordonnées du premier point servant de point de référence. Cette approche évite l'intégration directe de ces paramètres dans le code source et facilite l'ajout de nouvelles géométries. Cela rend le flux expérimental plus reproductible également en évitant de changer la méthode logicielle pour l'acquisition. L'ajout d'un nouveau design consiste simplement à créer un fichier TOML de configuration correspondant et à l'ajouter au dossier dédié.

Lorsqu'un dispositif est sélectionné dans LOCARS, la fonction *load_chip_toml* est appelée afin de charger le fichier de configuration correspondant. Cette fonction lit le fichier TOML, extrait les paramètres géométriques et transmet ces informations à la fonction *generate_wells*. Cette dernière génère automatiquement la grille de positions correspondant aux coordonnées du dispositif sélectionné, comme illustré à la Figure 4.7a et 4.7b (en rouge).

Les coordonnées sont calculées à partir de la position du premier point et des espacements définis entre les coordonnées selon les axes horizontaux et verticaux. Pour chaque position générée, deux

actions sont effectuées. Premièrement, les coordonnées cartésiennes générées sont enregistrées dans un dictionnaire afin de permettre un accès rapide lors des déplacements automatisés du scanner. Deuxièmement, une grille de cases à cocher est générée dans l'interface graphique afin de représenter visuellement les coordonnées disponibles. L'utilisateur peut ainsi sélectionner directement les positions à analyser, ce qui simplifie la planification des acquisitions, notamment dans les situations où certaines coordonnées ne contiennent pas d'échantillons. Cette approche permet également de rendre l'interface facilement utilisable par les opérateurs du laboratoire sans nécessiter de modification du code ou de connaissances avancées en programmation.

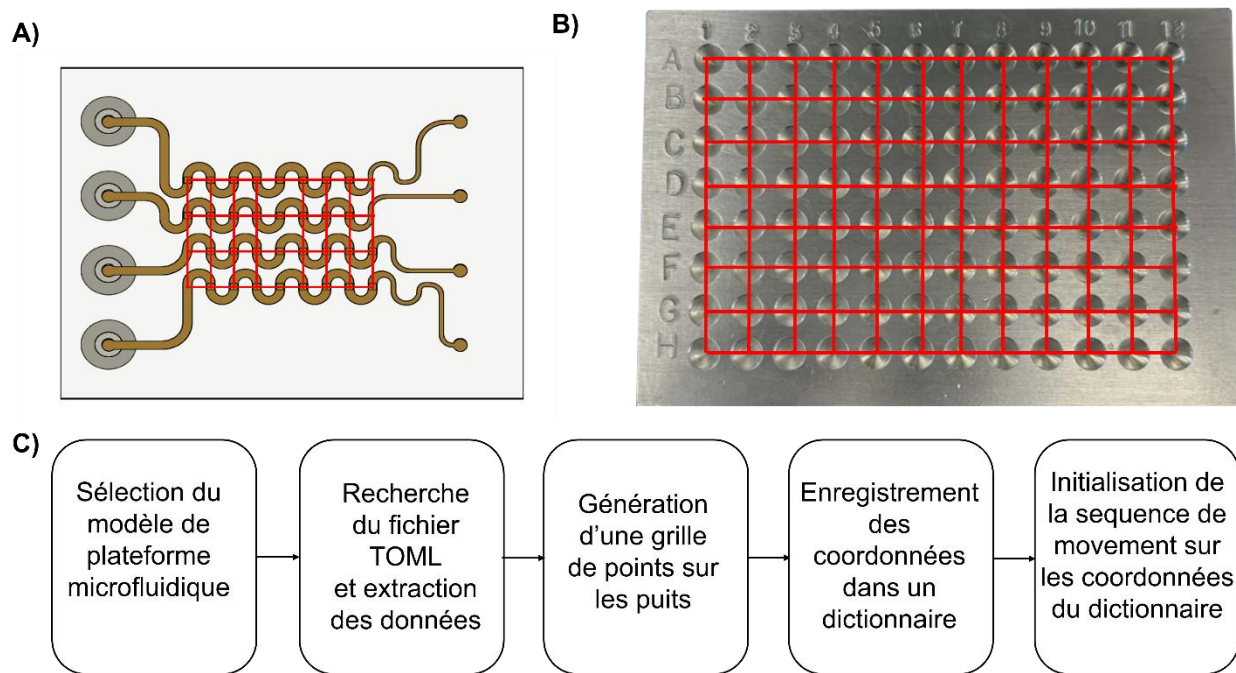


Figure 4.7 : Génération automatisée des coordonnées des différents dispositifs utilisés à partir d'un fichier de configuration. (A) Illustration d'une puce microfluidique vue de dessous, où la grille rouge représente les positions générées pour le positionnement de la sonde au-dessus des puits. (B) Illustration d'une plaque à puits vue de dessous, où la grille rouge représente les positions générées pour le positionnement de la sonde au-dessus des puits. (C) Schéma fonctionnel résumant le processus de génération des coordonnées et leur utilisation pour l'automatisation des déplacements du scanner.

L'utilisation de fichiers de configuration externes rend le système hautement modulaire. De nouveaux designs de dispositifs peuvent être intégrés simplement en ajoutant un fichier TOML décrivant leur géométrie, ce qui facilite l'extension future de la plateforme. La principale contrainte associée à cette approche provient de la résolution mécanique du système de translation utilisé. Le

stage motorisé dérivé de l'imprimante 3D se déplace selon des incréments de 100 μm . Les positions des coordonnées doivent donc être définies sur une grille compatible avec cette résolution afin d'assurer un positionnement reproductible de la sonde. Malgré cette limitation, ceci n'est pas un problème pour les deux dispositifs présentés dans ce travail, la plateforme microfluidique et la plaque à puits, car ces derniers nécessitent des déplacements de l'ordre du millimètre.

Dans l'ensemble, ce système de génération dynamique des coordonnées constitue un élément central de l'automatisation de la plateforme LOCARS, puisqu'il permet de transformer simplement la description géométrique d'un dispositif en une série de positions directement exploitables pour le contrôle du scanner et l'acquisition automatisée des spectres Raman.

4.5.2.3 Calibration

Afin d'assurer un positionnement reproductible de la sonde Raman au-dessus des puits microfluidiques, une procédure de calibration a été mise en place dans LOCARS. Cette calibration repose sur deux éléments complémentaires : une calibration logicielle définissant l'origine du système de coordonnées et une calibration mécanique garantissant l'alignement du dispositif avec les axes de déplacement du scanner.

La première étape consiste à définir une origine relative pour les déplacements du système. Une fonction dédiée, *calibrate_point*, permet d'enregistrer la position actuelle de la sonde comme point de référence (0,0) dans le système de coordonnées du stage motorisé. Cette opération est accessible via un bouton de calibration dans le troisième onglet de l'interface graphique.

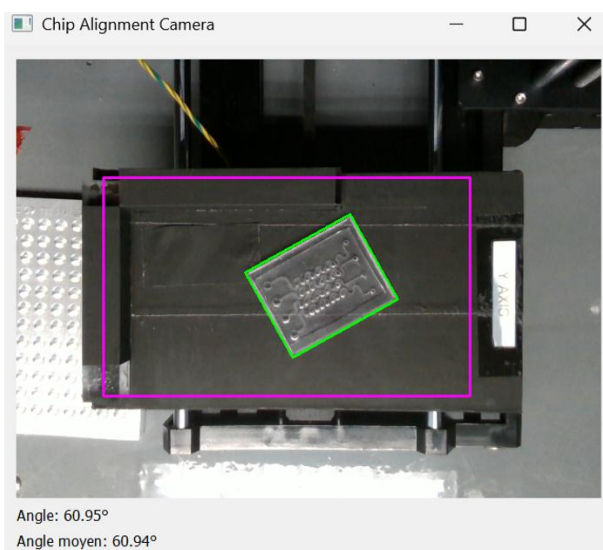
Lorsque l'utilisateur positionne manuellement la sonde au-dessus du premier point, l'activation de cette fonction permet de définir cette position comme origine du système de coordonnées. Le scanner récupère d'abord sa position actuelle, puis est configuré en mode de coordonnées absolues avant de redéfinir ce point comme référence.

Les coordonnées générées précédemment par le système de génération de coordonnées peuvent alors être interprétées comme des déplacements relatifs à partir de cette origine. Cette approche simplifie la préparation expérimentale, puisque l'utilisateur n'a qu'à aligner la sonde sur un seul point avant de lancer une séquence automatisée d'acquisitions sur l'ensemble du dispositif. Cependant, cette calibration logicielle ne garantit pas un positionnement précis si le dispositif n'est

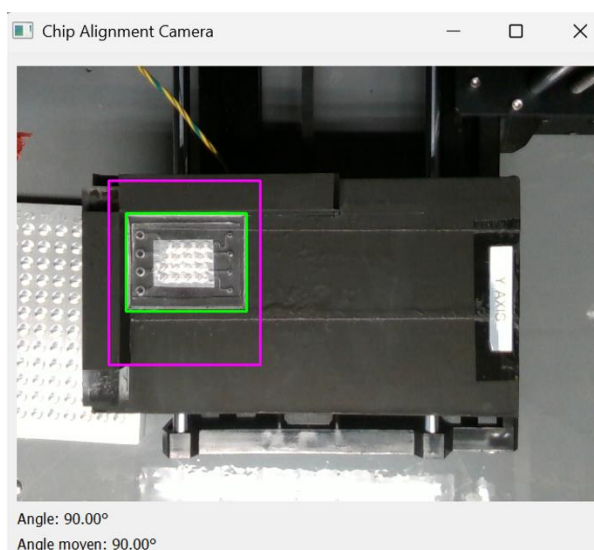
pas parfaitement aligné avec les axes du système de translation. Un léger angle entre ces derniers peut entraîner un décalage progressif entre les positions calculées et les positions réelles.

Pour résoudre ce problème, un dispositif d'alignement mécanique a été conçu et intégré au support. Ce dispositif consiste en un bloc d'alignement fixé à un angle prédéfini orthogonal avec les axes de mouvement de l'imprimante, permettant de positionner le dispositif de manière reproductible en la plaçant simplement contre les surfaces de référence du support. Ce système d'alignement mécanique a été développé dans le cadre du projet par une stagiaire (Cornelia Iachimov) travaillant sous la supervision de l'auteur. Une fois le dispositif placé dans ce support, son orientation relative par rapport aux axes du scanner devient orthogonale, ce qui garantit que les coordonnées générées par le logiciel correspondent aux positions physiques. Afin de faciliter la vérification de cet alignement, une fonction supplémentaire a également été implémentée dans le module de visualisation caméra (Figure 4.8). Cette fonction analyse en temps réel l'image capturée dans une région d'intérêt (ROI) définie par l'utilisateur et estime l'angle d'orientation du dispositif par rapport aux axes du système. L'angle détecté est affiché en direct dans l'interface, permettant à l'utilisateur de confirmer rapidement l'alignement avant de lancer une acquisition automatisée. L'ensemble de ces éléments constitue une procédure de calibration combinant correction logicielle et alignement mécanique, assurant un positionnement fiable de la sonde Raman au-dessus des coordonnées d'intérêt lors des acquisitions automatisées.

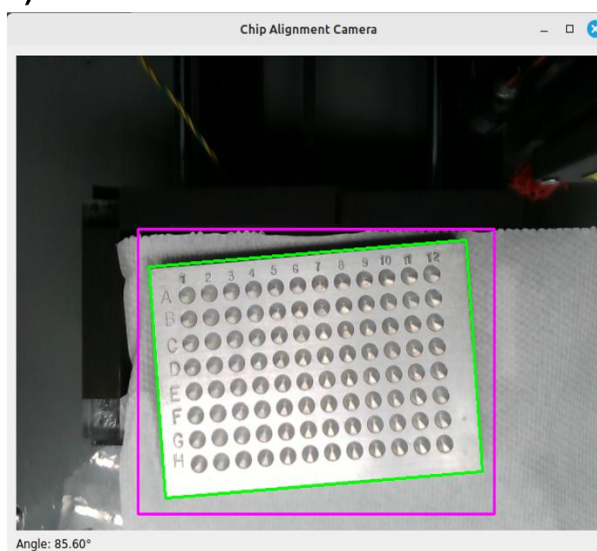
A)



B)



C)



D)

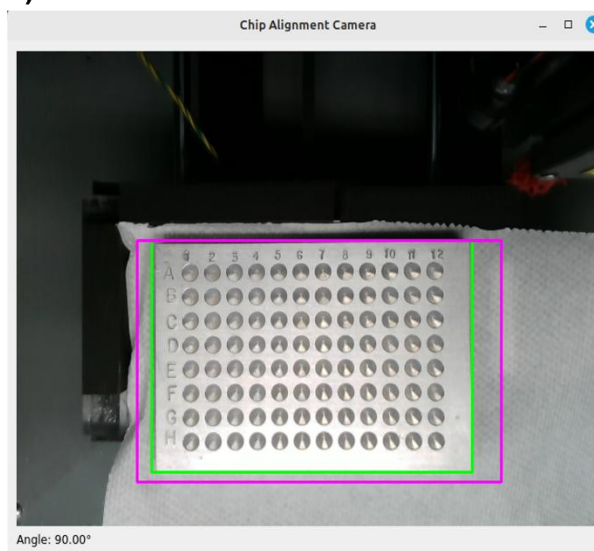


Figure 4.8 : Vérification de l'alignement des supports d'acquisition Raman par vision caméra. (A) Exemple d'une puce volontairement mal alignée par rapport aux axes du système, entraînant un angle détecté différent de l'orientation voulue. (B) Exemple d'une puce correctement positionnée dans le support d'alignement, où l'orientation mesurée correspond à l'alignement avec les axes du système de déplacement. (C) Exemple d'une plaque à puits volontairement mal alignée par rapport aux axes du système, entraînant un angle détecté différent de l'orientation voulue. (D) Exemple d'une plaque à puits correctement positionnée dans le support d'alignement, où l'orientation mesurée correspond à l'alignement avec les axes du système de déplacement.

4.5.2.4 Séquence d'acquisition

Une fois la calibration effectuée et les coordonnées d'intérêt sélectionnées, LOCARS permet de lancer une séquence d'acquisition automatisée couvrant l'ensemble des positions choisies. Cette logique est implémentée dans la fonction *move_to_wells_and_home*, qui coordonne les déplacements du scanner.

Au lancement, le logiciel vérifie les conditions nécessaires à l'exécution, notamment la connexion au système, la définition du point d'origine et la sélection de coordonnées actives. Les coordonnées sont ensuite converties en positions absolues à partir de cette origine.

Le système parcourt ensuite chaque coordonnée sélectionnée. Une stratégie de déplacement en trois étapes est utilisée afin de limiter les risques de collision : remontée de l'axe vertical, déplacement dans le plan XY, puis descente vers la position cible.

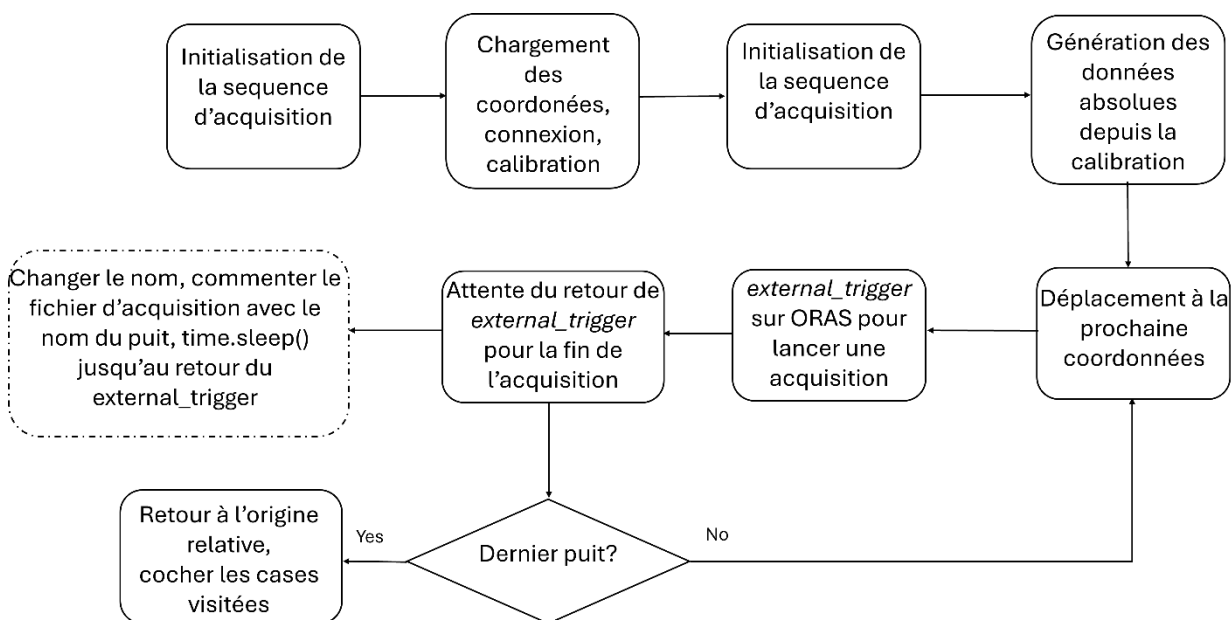


Figure 4.9 : Schéma fonctionnel d'une séquence d'acquisition automatisée dans LOCARS.

Initialisation de la séquence, chargement des coordonnées et du point de calibration, génération des positions absolues puis déplacement successif vers chaque coordonnée sélectionnée. À chaque position, un signal *external_trigger* est envoyé à ORAS pour déclencher l'acquisition Raman, et le système attend la fin de la mesure avant de poursuivre vers la coordonnée suivante. Une fois la séquence terminée, la sonde retourne à l'origine relative et les coordonnées visitées sont marquées dans l'interface.

Une fois en position, un signal *external_trigger* est envoyé à ORAS pour déclencher l'acquisition Raman. Le système attend la fin de la mesure avant de poursuivre vers la coordonnée suivante. Ce processus est répété pour l'ensemble des positions sélectionnées.

À la fin de la séquence, la sonde retourne automatiquement à la position d'origine, et les coordonnées visitées sont marquées dans l'interface afin de suivre la progression de l'expérience. La Figure 4.9 présente le schéma fonctionnel de cette séquence automatisée. L'ensemble des développements présentés dans ce chapitre constitue l'infrastructure expérimentale de la plateforme optofluidique utilisée dans ce travail. L'intégration de la sonde Raman, du système de translation et du logiciel LOCARS permet l'acquisition automatisée de spectres sur des explants tumoraux sur divers dispositifs, ouvrant la voie à leur étude longitudinale dans des conditions contrôlées.

CHAPITRE 5 IDENTIFICATION DU CONTENU TUMORAL DE TRANCHES TUMORALES PAR SPECTROSCOPIE RAMAN

5.1 Contexte scientifique

Comme discuté dans la revue de littérature, les approches histopathologiques conventionnelles constituent la référence pour l'identification du contenu des échantillons tumoraux. En particulier, la distinction entre l'épithélium tumoral, correspondant aux cellules cancéreuses, et le stroma est primordiale pour évaluer l'efficacité d'un traitement. Dans ce travail, la catégorie stromale est utilisée dans un sens opérationnel et regroupe l'ensemble des composantes tissulaires non épithéliales et non adipeuses. Toutefois, ces méthodes reposent sur des marquages destructifs et terminaux, incompatibles avec des analyses fonctionnelles longitudinales sur un même échantillon.

La composition initiale du tissu est donc inconnue au moment de l'intégration dans le dispositif microfluidique. Par la nature probabiliste du prélèvement, certains explants peuvent contenir majoritairement du stroma, voire être dépourvus d'épithélium tumoral, une information généralement révélée uniquement à l'analyse histologique finale. Il devient alors difficile de distinguer un effet thérapeutique réel d'une simple variabilité intrinsèque liée à l'hétérogénéité tissulaire, ce qui est particulièrement dommageable a posteriori.

Cette impasse oppose deux exigences: confirmer l'identité tissulaire en amont ou préserver l'échantillon pour des analyses fonctionnelles. À l'échelle microdisséquée, cette contrainte est accentuée par la diminution du signal exploitable pour une interrogation optique directe.

À ce stade, l'identification tissulaire directe sur des MDTs n'est pas réalisable de manière fiable. Leur composition ne peut être validée qu'à l'aide de méthodes destructives, et leur taille limite significativement le signal Raman exploitable, rendant incertaine la distinction des compartiments biologiques. Il est donc nécessaire de valider d'abord la faisabilité de la classification spectrale à une échelle où le signal est suffisant et où une référence histologique fiable peut être établie, soit la tranche tissulaire.

Exploitant le système développé au chapitre précédent, ce chapitre vise à établir la faisabilité de l'identification tissulaire par spectroscopie Raman. Étant donné que la capacité de cette approche à distinguer les compartiments biologiques n'est pas établie a priori dans la littérature ou des études de nos groupes, l'analyse est d'abord réalisée à l'échelle de tranches de tissu. Leur volume supérieur permet d'obtenir un signal suffisant et de s'affranchir d'une optimisation instrumentale immédiate, tout en permettant une validation directe avec les analyses histologiques de référence (H&E).

5.2 Méthode expérimentale

5.2.1 Cohorte de patients et critères de stratification

Une cohorte de neuf patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire et ayant subi une résection chirurgicale a été incluse dans cette étude. Le cancer de l'ovaire est choisi étant donné que 90% des cas sont d'origine épithéliale. Ceci en fait un modèle pertinent pour l'identification de l'épithélium tumoral par spectroscopie Raman¹¹⁶.

Tous les échantillons humains ont été prélevés auprès de patientes après obtention d'un consentement éclairé au Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Division d'oncologie gynécologique. Les échantillons ont été traités et préparés en format de tranche immédiatement après leur prélèvement. L'utilisation de ces échantillons a été approuvée par le Comité d'éthique de la recherche du CHUM (CÉR-CHUM).

Les échantillons ont été classés en trois catégories tissulaires : épithélium tumoral, stroma et tissu adipeux. Un seuil minimal de contenu tumoral ($\geq 30\%$), estimé par analyse histopathologique et par immunofluorescence, est classiquement requis pour garantir la représentativité des analyses moléculaires, le pourcentage de cellules tumorales constituant un paramètre critique évalué en routine par les pathologistes¹¹⁷. La borne supérieure de ce seuil a donc été utilisée ici pour définir la classe épithéliale. Les échantillons présentant une proportion inférieure d'épithélium ont été classés comme stromaux. Le tissu adipeux a été inclus comme classe distincte en raison de sa signature spectrale fortement caractéristique, servant également de contrôle interne de qualité du signal Raman.

5.2.2 Préparation des échantillons et flux expérimental

À la réception des échantillons tumoraux, une analyse macroscopique et visuelle a été réalisée par une biologiste (Sabrina Ritch, spécialisée en pathologie) afin d'identifier les régions présentant des différences de couleur et de texture, correspondant potentiellement à des types tissulaires distincts. Dans le flux clinique standard, une tranche tissulaire est à ce moment prélevée, fixée puis colorée au H&E, un marqueur morphologique permettant d'identifier la composition tissulaire. Cette procédure est destructive et repose sur l'hypothèse que la tranche analysée est représentative de l'ensemble du tissu.

Dans ce travail, une stratégie alternative a été mise en place afin de corréliser précisément les mesures spectrales aux marquages H&E de l'échantillon. Des tranches tumorales macroscopiques ont été générées à l'aide d'un *McIlwain tissue chopper* (10180, Ted Pella, Redding, CA, USA) d'une épaisseur d'approx. 350 μm d'épaisseur et à partir de fragments initiaux (approx. 1 cm^3). Elles sont ensuite maintenues en solution physiologique (HBSS supplémenté) jusqu'à l'acquisition. Une acquisition spectrale initiale par spectroscopie Raman a été réalisée directement sur ces tranches intactes. Après l'acquisition Raman, les mêmes tranches ont été fixées, incluses en paraffine, sectionnées en tranches de 4 μm au microtome et colorées par H&E selon des protocoles standards histologiques.

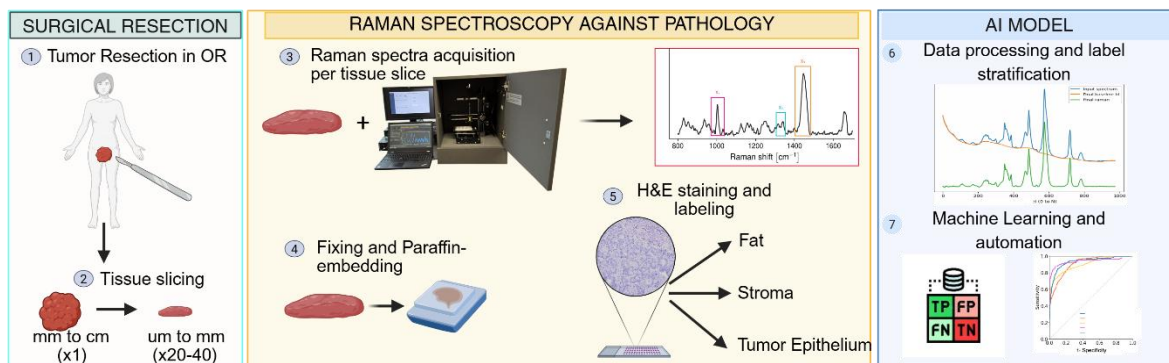


Figure 5.1: Schéma du protocole expérimental comparant la spectroscopie Raman à l'histopathologie conventionnelle. Après résection chirurgicale et sectionnement du tissu, des acquisitions spectroscopiques Raman sont réalisées sur des tranches tissulaires intactes. Les mêmes tranches sont ensuite fixées, incluses en paraffine et colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E) afin d'obtenir une catégorisation histopathologique de référence (épithélium tumoral, stroma, tissu adipeux). Les données spectrales sont finalement traitées et utilisées pour entraîner un modèle d'apprentissage automatique visant l'identification tissulaire non destructive.

Les lames ont ensuite été analysées par un pathologiste, permettant d'associer à chaque acquisition Raman une catégorie tissulaire de référence basée sur son marquage. Les acquisitions et analyses histopathologiques ont été réalisées entre juillet 2025 et mars 2026. La Figure 5.1 présente un schéma du protocole intégral, jusqu'à l'entraînement des modèles de classification.

5.2.3 Véhicule : Plaque à puits

Pour l'analyse d'explants tumoraux sous forme de tranches, l'utilisation d'une puce microfluidique n'est pas nécessaire en raison de la taille plus importante des échantillons. Cependant, afin de conserver un format compatible avec l'acquisition automatisée développée au chapitre précédent, un support permettant l'organisation de plusieurs échantillons est requis. Les plaques à puits constituent une solution naturelle pour ce type d'expérience.

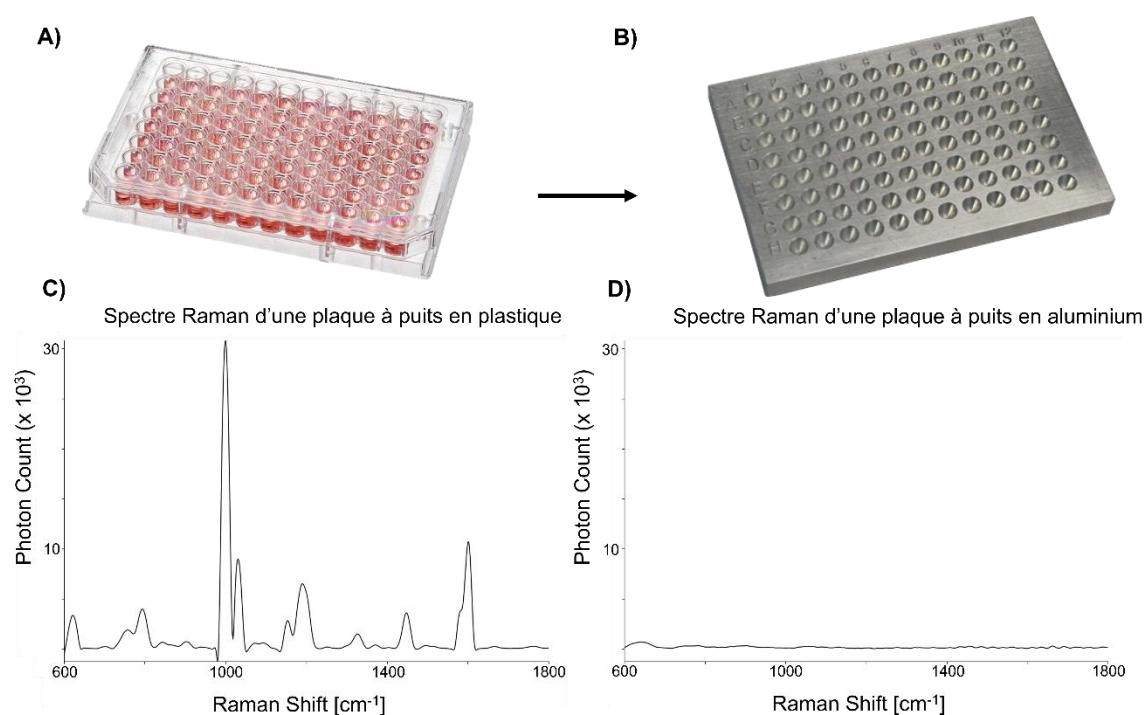


Figure 5.2 : Comparaison du signal spectral provenant d'une plaque à puits commerciale en plastique et d'une plaque à puits en aluminium développée dans ce travail. Photographies d'une plaque standard de culture cellulaire (A) et de la plaque usinée dans un bloc massif d'aluminium (B). Spectres Raman représentatifs acquis à partir de la plaque de plastique (C) et d'aluminium (D). La plaque en aluminium ne montre aucun signal Raman significatif dans cette région, permettant des acquisitions spectrales sans interférence du support.

La plaque plastique présente une signature spectrale parasite, incluant un pic intense autour de 1003 cm^{-1} qui interfère avec le pic de phénylalanine à 1004 cm^{-1} utilisé comme référence spectrale. Les plaques commerciales en polystyrène présentent en revanche une signature Raman parasite, incluant un pic intense autour de 1003 cm^{-1} , interférant avec le pic de phénylalanine à 1004 cm^{-1} utilisé comme référence spectrale. Afin d'éliminer ces contributions, une plaque à puits a été usinée dans un bloc d'aluminium massif, matériau présentant un signal Raman négligeable¹¹⁸. Cette approche permet d'obtenir un support dépourvu d'interférences dans la région spectrale d'intérêt, sans recours à des revêtements de surface. La Figure 5.2 compare la plaque à puits développée dans ce travail à une plaque classique en plastique. Toutes les mesures présentées dans ce chapitre auront donc comme dispositif la plaque à puits en aluminium présenté à la Figure 5.2b.

5.2.4 Analyse histologique et par immunofluorescence

Les catégories tissulaires ont été validées par histopathologie et immunofluorescence. Les coupes de $4\text{ }\mu\text{m}$ ont été traitées à l'aide d'un système automatisé (Discovery Ultra, Ventana). Après récupération antigénique, les anticorps primaires ont été incubés pendant 60 minutes à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, suivis des anticorps secondaires fluorescents. Le marquage nucléaire a été réalisé avec le DAPI, tandis que l'épithélium tumoral a été identifié par marquage pan-cytokératine (Pan-CK). Un marquage H&E a également été réalisé pour identifier les tissus gras, les adipocytes étant des cellules de grande taille (jusqu'à $150\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre) présentant un effet de « vide » unique au marquage H&E qui confère un aspect clair caractéristique, facilitant leur distinction des compartiments stromaux et épithéliaux¹¹⁹.

Les lames ont été numérisées à l'aide d'un microscope Olympus BX61, puis analysées avec le logiciel VisiomorphDP (VisioPharm) à l'aide de méthodes de seuillage. Les métriques extraites incluent la surface tissulaire totale, la densité nucléaire (DAPI) et la surface épithéliale (Pan-CK). Ces annotations ont été utilisées pour séparer les types de tissu de façon suivante : un tissu épithélial devait avoir un signal Pan-CK positif/nombre de noyaux supérieur à 30%. Un échantillon gras devait présenter des alvéoles vides au H&E et avoir des niveaux bas de DAPI et Pan-CK. Le reste était placé dans la catégorie stromale. L'ensemble des résultats statistiques découlant des images histologiques et présentés sur des histogrammes sont des ANOVA à double effet et réalisés avec GraphPad Prism (version 10.3, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5.2.5 Acquisition spectroscopique Raman

Les acquisitions Raman ont été réalisées à l'aide de la sonde fibrée décrite au chapitre 4, connectée à un laser proche infrarouge (785 nm). La puissance d'excitation utilisée était typiquement de 150 mW, ou 750 mA selon l'interface graphique ORAS. Les spectres ont été acquis dans une plage de 600 à 2000 cm^{-1} , avec une résolution spectrale d'environ 1.8 cm^{-1} , à l'aide d'un détecteur CCD refroidi à -70 °C. Une acquisition résultait de l'accumulation de 25 spectres moyennés ensemble pour réduire le bruit statistique. Le temps d'exposition était limité à 2500 millisecondes.

5.2.6 Traitement du signal et contrôle de qualité

Les spectres Raman ont été traités à travers la librairie ORPL, calibrés avec du Tylenol et le SRM-2241 du NIST⁸², puis normalisés par la méthode *Standard Normal Variate* (SNV) afin de réduire les effets de diffusion et de variations d'intensité inter spectres.

Un facteur de qualité spectrale (QF), compris entre 0 et 1, a été calculé pour chaque spectre afin de sélectionner les spectres d'entraînement qui ne fausseraient pas les résultats. Ce facteur est défini comme la moyenne signée du carré des intensités normalisées :

$$QF = \frac{1}{N} \sum_i \text{sgn}(r_i) \cdot r_i^2$$

où r_i correspond aux intensités du spectre normalisé.

Les spectres dominés par le bruit présentent des valeurs de QF proches de 0, tandis que les spectres contenant des signatures Raman reproductibles présentent des valeurs plus élevées. Un seuil de QF > 0.4 a été appliqué afin de sélectionner les spectres utilisés pour l'entraînement des modèles.

Les spectres ont ensuite été regroupés par catégorie tissulaire et moyennés afin de générer des profils spectraux de référence. Comme le gras présente une signature Raman distincte, une analyse différentielle a été réalisée entre épithélium tumoral et stroma seulement pour distinguer les différences biochimiques de ces deux compartiments biologiques selon la différence $\Delta(E-S)$.

5.2.7 Classification

Un classificateur basé sur le *Spectral Angle Mapper* (SAM) a été utilisé pour discriminer les différentes catégories tissulaires.

Chaque spectre est représenté comme un vecteur normalisé, et la similarité entre un spectre inconnu et une classe donnée est évaluée par l'angle spectral entre ce spectre et un spectre de référence moyen de la classe. La classe prédite correspond à celle minimisant cet angle. Il s'agit ainsi d'une simple corrélation entre vecteurs.

Afin d'évaluer la robustesse face à la variabilité inter-observateur, nous avons conçu un nouveau type d'analyse où plusieurs pathologistes ont indépendamment annoté le même ensemble de données et de marquage. Plusieurs ensembles d'annotations pathologiques indépendants sont ainsi créés, chacun est utilisé pour entraîner des modèles distincts et ainsi comparer les performances. Cette stratégie est analogue au principe de validation croisée en entraînement d'intelligence artificielle.

Les performances ont été évaluées à l'aide des courbes ROC, d'exactitude, de sensibilité et de spécificité et avec l'aire sous la courbe (AUC).

5.2.8 Analyse statistique et score d'enrichissement épithélial

Une corrélation de Spearman a été utilisée afin d'évaluer la relation monotone entre le contenu épithélial mesuré par immunofluorescence et les signatures Raman. Un test de Pearson a également été effectué.

Afin d'établir une relation entre le contenu épithélial et des caractéristiques spectrales, un score d'enrichissement épithélial a été défini en combinant des contributions spectrales associées positivement et négativement à l'épithélium. La corrélation de Spearman a permis d'identifier des régions spectrales dont l'intensité varie de manière monotone avec le contenu épithélial, parmi lesquelles seules celles présentant une interprétation biologique cohérente ont été retenues.

Le score est défini comme la différence entre les intensités moyennes normalisées (z-score) de bandes associées positivement à l'épithélium et celles associées négativement, soit $Z(\text{bandes positives}) - Z(\text{bandes négatives})$. Cette formulation permet de combiner des contributions spectrales de nature différente sur une échelle commune.

Ce score projette chaque spectre sur un axe continu allant d'une dominance stromale à une dominance épithéliale. Il constitue un indice relatif, dépendant de la distribution des données au sein du jeu analysé, plutôt qu'une mesure absolue du contenu épithélial.

Le score d'enrichissement épithélial repose sur des bandes spectrales dont l'intensité varie de manière cohérente avec la composition tissulaire. Les contributions principales proviennent de régions situées autour de $1670\text{-}1709\text{ cm}^{-1}$ (Amide I), $1428\text{-}1443\text{ cm}^{-1}$ (déformations CH_2/CH_3), ainsi que $854\text{-}865\text{ cm}^{-1}$ et $658\text{-}668\text{ cm}^{-1}$, généralement associées à des modes protéiques et aromatiques. Ces régions reflètent des variations de composition biochimique entre compartiments épithéliaux et stromaux, permettant de positionner chaque spectre le long d'un continuum de composition tissulaire. Les principales analyses statistiques sont présentées en [Annexe C](#).

5.3 Résultats

5.3.1 Validation histologique des catégories tissulaires

La classification des échantillons en trois catégories tissulaires, soit épithélium tumoral, stroma et tissu adipeux, a d'abord été validée par histopathologie et immunofluorescence.

Le marquage nucléaire (DAPI) permet en premier lieu de quantifier la densité cellulaire et de mettre en évidence des différences morphologiques marquées entre les compartiments. Les régions épithéliales tumorales présentent une forte densité de noyaux, caractéristique de cellules étroitement compactées. À l'inverse, les tissus stromaux montrent une densité nucléaire plus faible, avec des cellules dispersées au sein d'une matrice extracellulaire. Le tissu adipeux se distingue par une densité nucléaire très faible, liée à la présence de grandes cellules contenant un unique noyau périphérique. Ces différences sont quantifiées à la Figure 5.3B, où la densité nucléaire est significativement plus élevée dans les régions épithéliales que dans les compartiments stromaux et adipeux.

À partir de ces cellules identifiées par DAPI, le marquage Pan-CK est utilisé pour déterminer la proportion de cellules d'origine épithéliale. Les régions riches en épithélium tumoral présentent un fort pourcentage de cellules Pan-CK positives, tandis que les tissus stromaux et adipeux montrent un signal épithélial négligeable. Cette distinction est également observée quantitativement (Figure 5.3C), confirmant la spécificité du marquage Pan-CK pour l'identification des compartiments épithéliaux.

Prises ensemble, ces observations confirment que les annotations et marquages utilisés comme référence permettent une identification fiable des différents compartiments tissulaires.

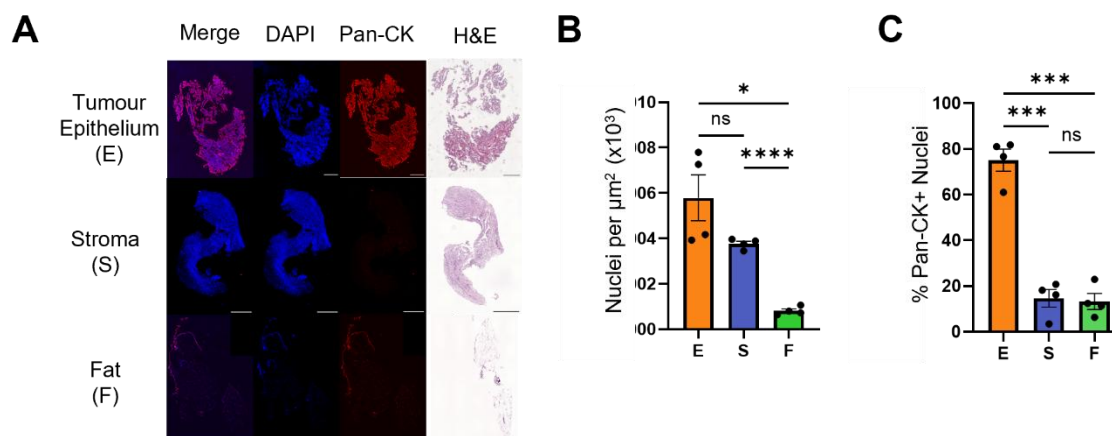


Figure 5.3 : Caractérisation histologique et par immunofluorescence des différentes catégories tissulaires sur des tranches de tissu entière de cancer ovarien obtenues de patients. Images représentatives d'immunofluorescence montrant le marquage nucléaire (DAPI, bleu) et le marquage épithélial (Pan-CK, rouge), accompagnées des coupes correspondantes colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E). Les tissus présentant une forte proportion d'épithélium tumoral montrent un marquage Pan-CK abondant, tandis que les échantillons stromaux et adipeux présentent un signal épithélial limité. Les graphiques quantifient la densité nucléaire (noyaux par μm^2) ainsi que la proportion de cellules Pan-CK positives pour chaque catégorie tissulaire. Les points représentent des échantillons individuels, les barres indiquant la moyenne. E est pour Épithélium tumoral, S pour Stroma et F pour le Gras. Les barres d'échelle sont de 500 μm .

5.3.2 Signatures spectrales des compartiments tissulaires

Une fois les échantillons pertinents identifiés par marquage suivant la méthode expliquée, les acquisitions Raman correspondantes ont été regroupées selon leur étiquette, puis moyennées afin de générer des profils spectraux représentatifs pour chaque classe tissulaire. Ainsi, un spectre dans la catégorie stromale y est parce que ses marquages l'identifiaient comme tel. Les spectres Raman moyens des trois catégories tissulaires sont présentés à la Figure 5.4 (panneau supérieur).

Le tissu adipeux présente un signal d'intensité élevée et relativement lisse, reflétant une signature lipidique dominante. À l'inverse, les spectres de l'épithélium tumoral et du stroma sont plus proches l'un de l'autre, avec des différences plus subtiles réparties sur plusieurs bandes spectrales. Une analyse différentielle des spectres a ensuite été réalisée, présentée dans le panneau inférieur. La carte de couleur représente la différence spectrale moyenne entre épithélium et stroma $\Delta(E-S)$ dont l'échelle de couleur est centrée sur le code point milieu entre les codes hexadécimaux utilisés

pour représenter respectivement l'épithélium et le stroma. Une valeur positive dans ce panneau indique une intensité plus élevée dans l'épithélium. Ces résultats semblent indiquer que, malgré une forte similarité globale, les signatures Raman contiennent de l'information discriminante entre épithélium tumoral et stroma.

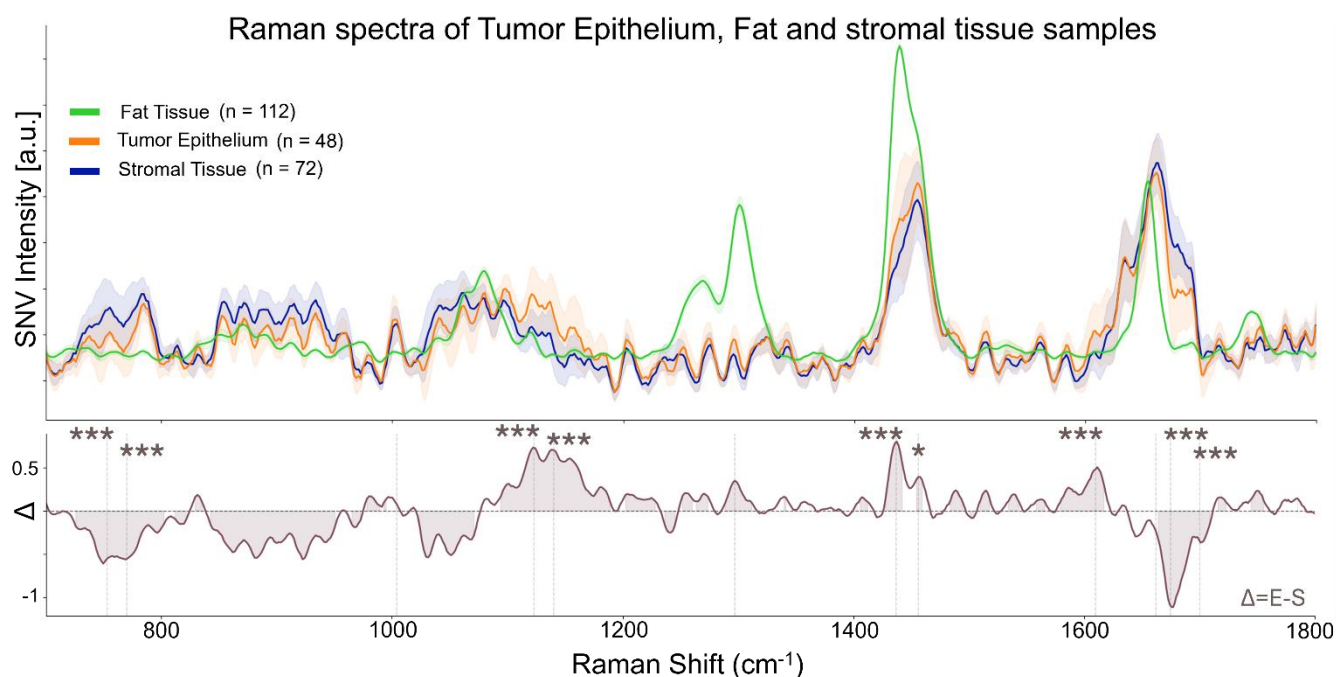


Figure 5.4 : Profils spectraux Raman moyens des différents compartiments tissulaires. Panneau supérieur : spectres Raman moyens ($\pm$ écart-type) du tissu adipeux (vert, $n = 112$), de l'épithélium tumoral (orange, $n = 48$) et du stroma (bleu, $n = 72$). Le tissu adipeux présente des pics d'intensité plus marqués, reflétant une signature lipidique dominante, tandis que les spectres de l'épithélium et du stroma montrent des différences plus subtiles. Panneau inférieur : différence spectrale moyenne $\Delta(E-S)$ entre épithélium tumoral et stroma. Les valeurs positives indiquent une intensité plus élevée dans l'épithélium. Les régions marquées par des astérisques correspondent aux intervalles présentant des différences statistiquement significatives.

5.3.3 Performance de classification des signatures Raman

La capacité de classification des signatures spectrales a été évaluée à l'aide du modèle SAM. Les performances sont présentées à la Figure 5.5a. Les courbes ROC montrent une bonne séparation entre les classes tissulaires, avec des performances nettement supérieures à une classification aléatoire ($AUC = 0.5$), et une précision globale comprise entre 84 % et 90 %. Le tissu adipeux est

particulièrement bien identifié, ce qui est cohérent avec sa signature spectrale distincte, tandis que la discrimination entre épithélium tumoral et stroma demeure plus difficile, mais significative.

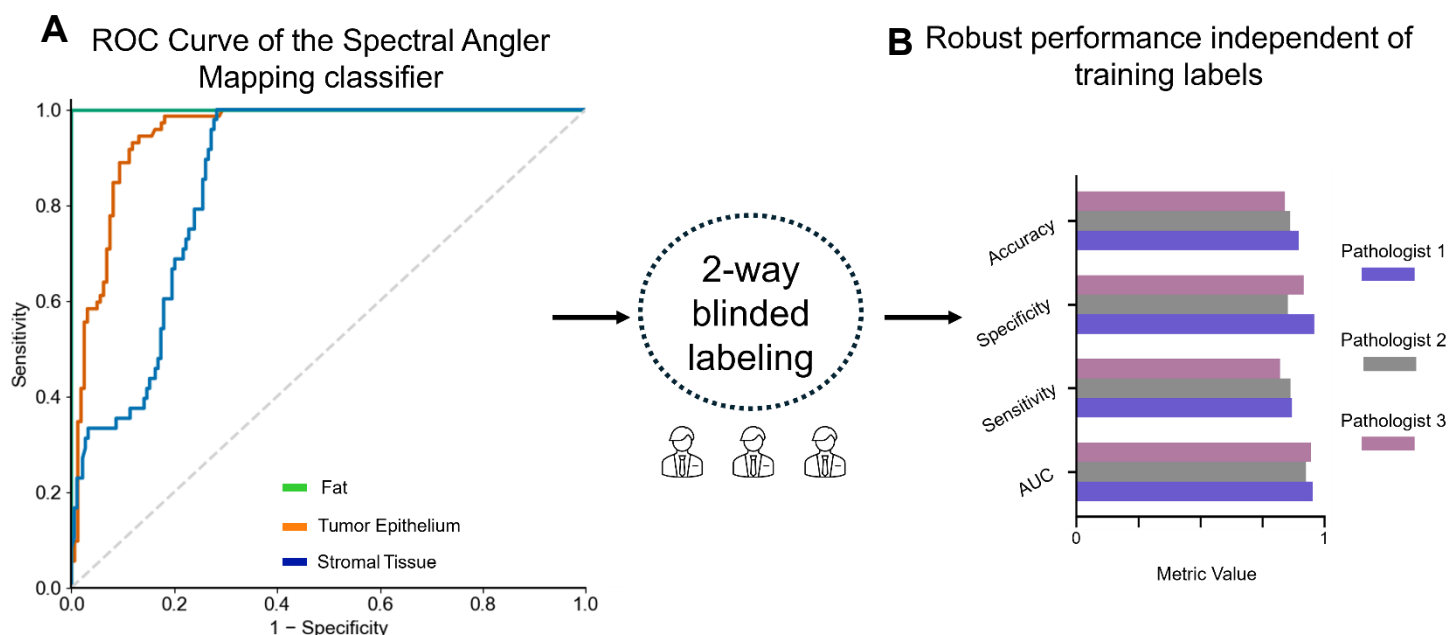


Figure 5.5: Performance de classification des signatures Raman pour les différentes classes tissulaires. (A) Courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) obtenues pour la classification du tissu gras, de l'épithélium tumoral et du stroma à partir des données spectroscopiques Raman du pathologiste 1. La ligne pointillée représente une classification aléatoire (AUC = 0.5). (B) Performances quantitatives du modèle d'apprentissage automatique contre les entraînements des pathologistes, incluant les métriques principales (exactitude, sensibilité et spécificité) pour chaque classe tissulaire.

Afin d'évaluer la robustesse du modèle face à la variabilité d'annotation, plusieurs ensembles indépendants issus de différents pathologistes ont été utilisés pour entraîner des modèles SAM distincts. La comparaison des performances (Table 5.1) met en évidence un résultat central : la variabilité inter-observateur dans l'annotation histopathologique atteint jusqu'à 7.2 %, alors que la variabilité de précision du modèle SAM, entraîné sur ces différentes annotations, reste limitée à 2.3 %.

Les performances obtenues par le SAM demeurent comparables entre ces ensembles, ce qui indique que la classification spectrale n'est pas fortement dépendante d'un seul observateur. Les performances du SAM sont comparées dans la Figure 5.5b. Afin de reproduire le contexte d'analyse propre à chaque expert, chaque pathologiste a eu accès aux types de marquages correspondant à sa pratique quotidienne. Ainsi, le pathologiste de recherche a reçu l'ensemble des

images disponibles, incluant l'immunofluorescence et les colorations H&E, tandis que le pathologiste clinique, intervenant dans un contexte d'évaluation de marges chirurgicales, s'est limité aux images H&E, qui constituent l'outil principal en pratique diagnostic rapide.

Tableau 5.1 : Performances d'annotation et de classification des pathologistes versus le SAM découlant de chaque ensemble d'annotation.

	Étiquette de l'annotation			Performances du SAM			
Pathologiste	F	E	S	AUC	Sensitivity	Specificity	Accuracy
1	112	48	72	0,952517	0,86875	0,958333	0,896552
2	112	32	88	0,925356	0,863636	0,8529	0,862
3	112	52	68	0,945199	0,82065	0,916667	0,8405

Ces résultats indiquent que les signatures Raman permettent une classification fiable des principaux compartiments tissulaires, tout en étant plus stable que la variabilité d'annotation humaine. Ils suggèrent également que, dans ce contexte, la limite de performance est en partie imposée par la variabilité intrinsèque de la référence histopathologique elle-même.

5.3.4 Estimation du contenu épithélial à partir du signal Raman

La relation entre le contenu épithélial mesuré par immunofluorescence et le signal Raman a été évaluée sur l'ensemble de tranches tissulaires qui n'étaient pas classées comme grasses. Les résultats sont présentés à la Figure 5.6.

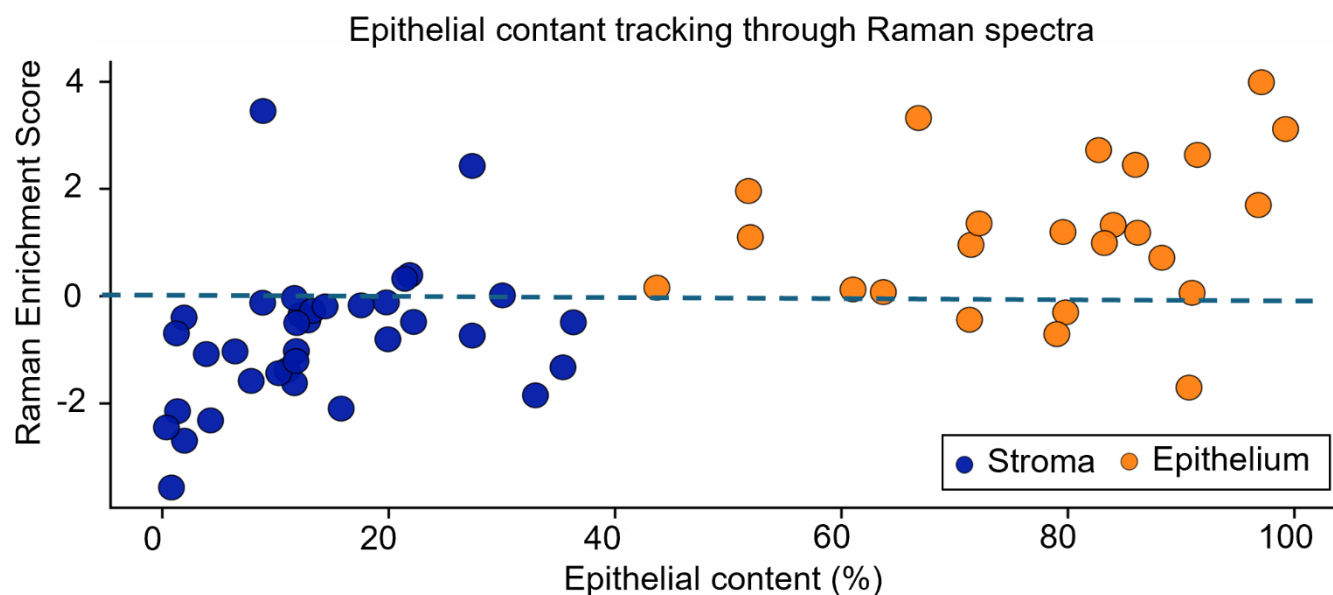


Figure 5.6 : Corrélation entre le score d'enrichissement épithélial Raman et le contenu épithélial mesuré histologiquement. Chaque point représente une tranche tissulaire ($n = 60$), colorée selon sa catégorie dominante (stroma en bleu, épithélium en orange). L'axe horizontal correspond au pourcentage d'épithélium tumoral déterminé par immunofluorescence, et l'axe vertical au score d'enrichissement épithélial dérivé des signatures Raman. La ligne pointillée indique le seuil séparant dominance stromale et épithéliale. Une corrélation de Spearman $\rho = 0.63$ ($p < 0.001$) met en évidence une relation monotone significative entre le contenu épithélial et le signal spectroscopique.

Chaque point correspond à une tranche, positionnée selon son pourcentage d'épithélium tumoral et un score d'enrichissement épithélial dérivé des signatures Raman. Une tendance est observée, indiquant que l'augmentation du contenu épithélial s'accompagne d'une augmentation du signal Raman associé à l'épithélium selon le score défini. La corrélation de Spearman obtenue ($\rho = 0.67$, $p < 0.001$) confirme l'existence d'une relation significative et non aléatoire entre ces deux variables, sans identifier cette relation. Comme attendu dans des tissus biologiques hétérogènes, cette relation n'est pas strictement linéaire, mais elle reste cohérente sur l'ensemble des

échantillons. Le test de Pearson ($r = 0.63$, $p < 0.001$) semble indiquer que la relation pourrait être linéaire, sans l'identifier.

5.4 Discussion et analyse

L'analyse histopathologique demeure la méthode de référence pour l'identification des compartiments tissulaires. Cependant, elle repose sur un processus destructif, long et exigeant en ressources, incluant la fixation, l'inclusion en paraffine, la coupe, le marquage et l'analyse par un expert. Dans le cadre de cette étude, la génération du jeu de données de référence a nécessité plusieurs mois de travail cumulatif, de juillet 2025 à mars 2026. Cette réalité met en évidence le coût expérimental associé à l'établissement d'une vérité terrain fiable, et souligne davantage le besoin de méthodes complémentaires permettant une caractérisation plus rapide et non destructive.

La présente étude visait à déterminer si la spectroscopie Raman permet une identification fiable des compartiments tissulaires dans des explants ovariens, tout en préservant l'échantillon pour des analyses fonctionnelles ultérieures. Contrairement à l'histopathologie, qui fournit une information morphologique détaillée et spatiale, mais terminale, l'approche Raman permet une interrogation directe de la composition biochimique du tissu, avec un temps d'acquisition de l'ordre de quelques secondes par échantillon.

5.4.1 Validation biologique des signatures spectrales

À la suite de la validation histologique et par immunofluorescence des catégories tissulaires (Figure 5.3), les signatures spectrales Raman correspondantes ont été analysées. Les différences observées s'alignent avec les connaissances biochimiques établies dans la littérature. Les bandes plus intenses dans le stroma (753 , 770 et 1675 cm^{-1}) sont associées aux protéines structurales et aux composantes riches en collagène de la matrice extracellulaire, cohérentes avec la composition du stroma tumoral dominé par des structures conjonctives. À l'inverse, les bandes plus marquées dans l'épithélium tumoral (1123 - 1456 , 1610 et 1690 cm^{-1}) sont associées aux lipides et aux phospholipides membranaires, reflétant une densité cellulaire plus élevée et une activité métabolique accrue.

L'absence de différences significatives aux positions 1004 cm^{-1} (phénylalanine) et 1662 cm^{-1} (amide I), souvent utilisées comme références internes, suggère que le contraste observé repose sur des différences biochimiques spécifiques plutôt que sur une variation globale de la charge

protéique. La cohérence entre validation histologique, signatures spectrales et assignations biochimiques constitue un élément central de la robustesse de ces résultats.

5.4.2 Classification automatisée et variabilité inter-observateur

Les différences spectrales observées ont ensuite été exploitées par un classificateur basé sur le SAM. L'objectif n'était pas de proposer une innovation algorithmique, mais d'évaluer si un modèle simple, interprétable et robuste permettait de capturer l'information contenue dans les spectres.

Les performances obtenues sont comparables à celles rapportées dans la littérature pour la classification Raman de tissus tumoraux, où des modèles plus complexes sont souvent utilisés, parfois au prix d'une interprétabilité réduite et d'un besoin accru en données. Dans ce contexte, l'utilisation du SAM permet de démontrer que les différences spectrales observées sont suffisamment structurées pour être exploitées par une approche relativement simple.

La classification du stroma s'est révélée particulièrement robuste, ce qui s'explique par l'homogénéité biochimique relativement réduite de ce compartiment (0-30%). À l'inverse, la variabilité du contenu épithélial (30-99 %) introduit une dispersion plus importante des signatures spectrales. La classification du gras étant parfaite, ces résultats suggèrent une classification hiérarchique, isolant en premier les échantillons stromaux, puis gras afin de maximiser le contenu épithélial.

Une conclusion importante de ce travail est que les performances du classificateur demeurent stables indépendamment de l'expert ayant produit les annotations d'entraînement, avec une variabilité inférieure à celle observée entre pathologistes. Ce résultat suggère que le modèle ne dépend pas fortement d'une interprétation spécifique de l'histopathologie, mais qu'il apprend des caractéristiques spectrales robustes, partagées entre annotateurs. Autrement dit, malgré la variabilité inter-observateur bien documentée en pathologie^{117,120,121}, l'information biochimique captée par la spectroscopie Raman semble suffisamment structurée pour mener à des frontières de décision cohérentes.

Cela souligne une limite fondamentale des approches supervisées en histopathologie, où la qualité du modèle est intrinsèquement contrainte par la variabilité de la vérité terrain. Dans ce contexte, la stabilité du modèle peut être interprétée comme une forme de régularisation naturelle vis-à-vis des

divergences d'annotation, suggérant que certaines signatures biochimiques sont moins ambiguës que leur interprétation morphologique. Cette stabilité soulève toutefois une nuance importante : le modèle capture peut-être bien une réalité biologique sous-jacente, ou alors il converge peut-être vers des caractéristiques moyennes présentes dans les annotations disponibles. La robustesse observée peut ainsi être interprétée à la fois comme un indicateur de généralisabilité, mais aussi comme une possible perte de sensibilité aux subtilités morphologiques distinguées par les experts. Cette observation est cohérente avec la nature du signal Raman, qui reflète une composition biochimique globale plutôt qu'une organisation tissulaire spatiale. Enfin, la variabilité intrinsèque des annotations histopathologiques implique qu'un modèle supervisé ne peut, par définition, dépasser le niveau de cohérence de sa référence. Dans cette optique, des approches permettant de réduire cette variabilité, ou de mieux la modéliser, pourraient non seulement améliorer les performances des modèles, mais également contribuer à standardiser l'interprétation en pathologie. À ce titre, la stabilité observée du modèle pourrait également avoir des implications pour la formation, en facilitant l'apprentissage de critères plus reproductibles entre observateurs.

Dans ce contexte, l'approche ne vise pas à remplacer l'histopathologie, mais à la compléter. L'absence d'information spatiale limite son utilisation pour un diagnostic détaillé, mais sa capacité à fournir une mesure rapide, non destructive et relativement robuste de la composition tissulaire constitue un avantage significatif, notamment pour des applications à haut débit ou longitudinales.

5.4.3 Encodage continu du contenu épithélial

Au-delà de la classification discrète, les résultats suggèrent que le signal Raman encode une information continue liée à la composition tissulaire. Le score d'enrichissement épithélial projette les spectres sur un axe continu représentant les contributions épithéliales et stromales (Figure 5.6), indiquant que la variation spectrale ne se limite pas à des classifications binaires.

La corrélation observée, bien que modérément forte, est cohérente avec les différences d'échelle entre les modalités comparées. La spectroscopie Raman sonde un volume optique de plusieurs dizaines de microns, alors que l'histopathologie repose sur des coupes fines (approx. 4 μm), introduisant un décalage spatial et une intégration de signaux provenant de microenvironnements hétérogènes. Cette discordance limite intrinsèquement le niveau d'accord attendu entre les deux approches.

Au-delà de ces considérations techniques, la variabilité observée reflète également la nature du tissu tumoral, caractérisé par une hétérogénéité spatiale importante et des transitions progressives entre régions biologiquement distinctes. Dans ce contexte, le score ne doit pas être interprété comme une mesure quantitative directe du contenu épithélial, mais plutôt comme un indicateur relatif de composition tissulaire.

Néanmoins, le fait que ce score, construit sans calibration explicite, suive de manière monotone le contenu épithélial suggère que le signal Raman capture un axe biochimique pertinent. Les bandes contribuant au score correspondent à des régions associées à des structures protéiques et à l'organisation moléculaire des tissus, ce qui appuie l'existence d'une base biologique sous-jacente aux variations observées.

Une limitation de ce score est qu'il est autonome et se base sur la moyenne des bandes spectrales annotées. Cela veut dire qu'il est basé sur les données entièrement disponibles et qu'il dépend de celles-ci pour donner un score. Ainsi, il n'est pas possible de simplement estimer un nouveau contenu épithélial d'une nouvelle mesure sans l'ajouter au jeu de donnée et recalculer la moyenne spectrale. Ceci restera vrai tant que la taille du jeu de donnée restera restreinte.

Pris ensemble, ces résultats indiquent néanmoins que la spectroscopie Raman permet d'accéder à une représentation continue de la composition tissulaire. Cette propriété dépasse le cadre d'une classification catégorielle et ouvre la voie à des approches de régression visant à estimer, de manière non destructive, la composition relative des échantillons.

5.5 Limite et perspective

Une limitation importante de cette approche réside dans le fait que la classification par SAM est actuellement réalisée à l'échelle de la tranche, alors que l'unité biologique d'intérêt, le MDT, correspond à une subdivision supplémentaire du tissu. Cette réduction d'échelle peut accentuer les variations locales de composition tissulaire. Ainsi, une tranche identifiée comme épithéliale peut contenir des MDTs majoritairement stromaux. Cette limitation souligne la nécessité de développer des approches de classification à plus haute résolution, directement au niveau des MDTs, ce qui sera discuté au Chapitre 6. Par ailleurs, bien que les performances de classification soient encourageantes, elles doivent être interprétées dans le contexte d'une cohorte limitée. Une

validation sur des ensembles de données indépendants et plus larges sera nécessaire afin de confirmer comment les modèles sont généralisables.

Une autre limite est le classificateur lui-même. Un SAM est un outil pratique et rapide à implémenter, mais ce n'est pas un vrai algorithme d'apprentissage machine. La prochaine étape de cette automatisation serait d'entraîner un modèle SVM, couramment utilisé dans le Lumed Lab, afin de véritablement avoir une classification automatique.

Malgré ces limites, les résultats démontrent que la spectroscopie Raman permet une identification fiable des principaux compartiments tissulaires dans des explants tumoraux ovariens, tout en préservant l'intégrité de l'échantillon. Comparativement aux approches histopathologiques standards, cette méthode offre un compromis intéressant entre vitesse, non-destructivité et richesse d'information biochimique. Cet outil ouvre la voie à l'utilisation de la spectroscopie Raman comme test de contrôle qualité rapide des échantillons, en amont de leur intégration dans des plateformes expérimentales, notamment dans le cadre d'études longitudinales sur explants tumoraux viables.

CHAPITRE 6 CONCEPTION D'UNE PLATEFORME OPTOFLUIDIQUE

6.1 Plateforme expérimentale et mesures longitudinales : Collaboration industrielle 2

Le développement de cette technologie repose sur la capacité à suivre un même MDT au cours du temps, directement sur une plateforme microfluidique, sans manipulation ni transfert entre les acquisitions. Dans ce contexte, le dispositif expérimental constitue un élément critique, devant assurer à la fois la viabilité biologique des échantillons et la compatibilité avec les mesures spectroscopiques Raman.

Les plateformes microfluidiques conventionnelles, généralement fabriquées en PDMS, présentent une signature Raman intrinsèque qui interfère avec les régions spectrales d'intérêt pour l'analyse de tissus tumoraux (Figure 4.1). Cette limitation devient particulièrement critique dans une approche longitudinale, où les variations spectrales recherchées sont subtiles et évolutives.

Afin de répondre à ces contraintes, une plateforme optofluidique dédiée a été développée. Deux modifications majeures ont été apportées au design conventionnel (Figure 6.1). Premièrement, des ouvertures cylindriques (cheminées) ont été intégrées au-dessus de chaque puits afin d'assurer un trajet optique direct entre la sonde et l'échantillon, éliminant toute interaction du faisceau avec le PDMS.

Deuxièmement, les parois et le fond des puits ont été partiellement remplacés (approx. 500 μm) par de l'aluminium poreux, matériau biocompatible, perméable à l'oxygène et présentant un signal Raman négligeable (Figure 5.2). Ce choix résulte de contraintes combinées liées aux dimensions micrométriques du dispositif, aux tolérances d'usinage, au maintien de la porosité pour les échanges d'oxygène et au coût de fabrication. Les approches de dépôt de couches minces (ex. *sputtering*) ont été écartées en raison de leur incapacité à produire des structures poreuses et de leur coût prohibitif à ces épaisseurs. À l'inverse, une découpe mécanique directe aurait entraîné une déformation du matériau et une obstruction des pores.

Dans ce contexte, des insertions en aluminium poreux ont été spécifiquement conçues pour s'intégrer à la géométrie des puits et usinées par Electrical Discharge Machining (EDM) en

collaboration avec K&K Tools (Richelieu, QC). Cette approche permet d'atteindre une précision de l'ordre de 10 μm tout en préservant l'intégrité structurale et la porosité du matériau.

Cette architecture permet de découpler les contraintes biologiques et optiques du dispositif, en assurant simultanément un environnement compatible avec la culture d'explants et une acquisition Raman exempte de contributions parasites.

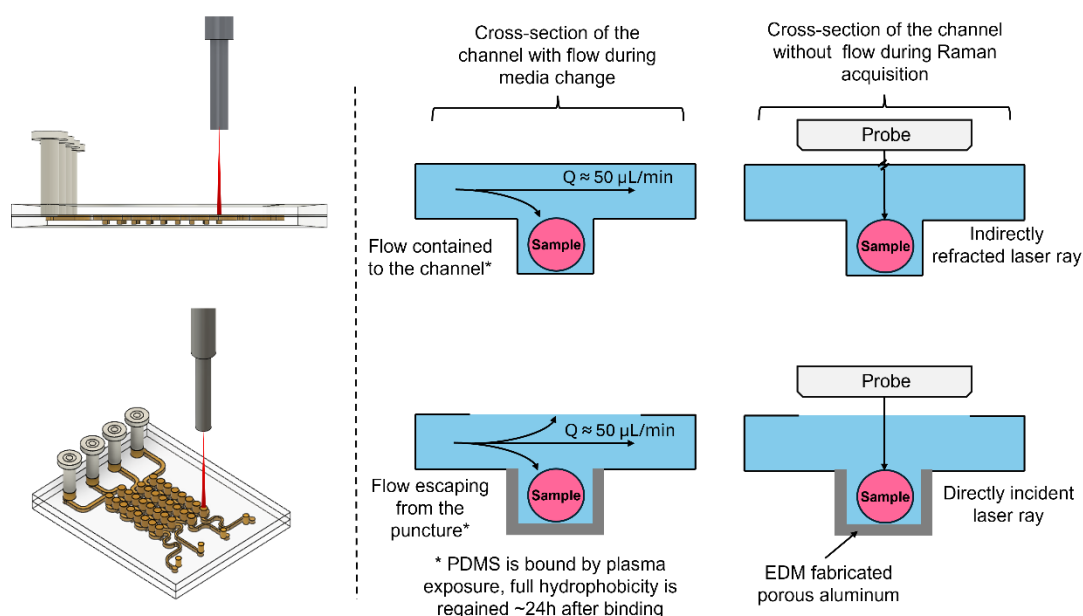


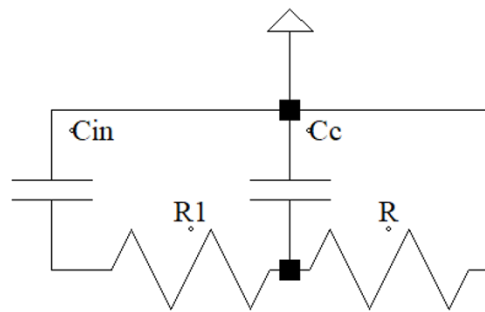
Figure 6.1 : Comparaison entre une puce microfluidique conventionnelle en PDMS et la puce optofluidique développée dans ce travail. Rangée du haut : configuration classique en PDMS, où le signal Raman est affecté par la contribution spectrale du matériau ainsi que par la réfraction du faisceau laser à l'interface, limitant la qualité des mesures. Rangée du bas : nouvelle puce intégrant des micropuits en aluminium usinés, permettant une incidence directe du faisceau sur l'échantillon et une réduction significative du signal parasite. La bande grise représente l'aluminium poreux épais de 500 microns. Le puits est 700 microns, le dessin n'est pas à l'échelle. Cette architecture assure un meilleur confinement de l'explant, une compatibilité avec un écoulement contrôlé et une acquisition Raman plus robuste en conditions longitudinales.

6.2 Modélisation de la plateforme optofluidique

Un modèle hydrodynamique simplifié, basé sur une analogie électrique, a été développé afin d'estimer les conditions d'opération permettant d'éviter les fuites au sein du dispositif. En effet, la présence de cheminées ouvertes au-dessus des puits introduit un point de décharge potentiel le long du canal microfluidique. Si la pression hydrostatique à l'entrée est trop élevée, le liquide

s'accumule au niveau de la première cheminée, entraînant une fuite et empêchant l'établissement d'un transport convectif le long du canal. Cela limite directement l'apport en nutriments aux échantillons situés en aval.

Afin de quantifier ce phénomène, un modèle équivalent hydraulique-électrique a été développé sous la supervision de l'auteur par une stagiaire (Cornelia Iachimov). Dans ce cadre, les résistances hydrauliques du canal et des cheminées sont modélisées par des résistances électriques, tandis que les différences de pression sont assimilées à des différences de potentiel. Les cheminées sont représentées par des éléments capacitifs associés à l'accumulation de volume. Ce modèle permet de déterminer le volume maximal pouvant être introduit à l'entrée du dispositif sans provoquer de fuite au niveau des puits en raison d'une pression hydrostatique trop importante. Le modèle



Critical puncture = 1st (C)

Assumptions :

- Wells neglected
- Holes have no resistance (0.2% of total)
- Hydrostatic pressure in holes neglected ($Bo = 0,07 \ll 1$)
- Worst case scenario: infinite speed pipette

$$t_{max} = [0,10 - 0,15]s$$

$$P_c(t) = P_0(e^{-t/RC_{in}})(1 - e^{-t/R_1C_c})$$

$$V_{max} = [103 ; 104] \mu L$$

$$\frac{dP_c(t)}{dt} = 0 \quad P_c(t) \geq \frac{2\gamma}{r_{in}}$$

Figure 6.2 : Modèle mathématique développé conjointement avec Cornelia Iachimov. P_c est la pression hydraulique aux cheminées, R_1 est la résistance associée au premier canal microfluidique, R est la résistance équivalente du reste du circuit. T_{max} est le temps maximal avant la décharge complète de C_{in} , V_{max} est le volume maximal équivalent que le système peut utiliser sans fuite.

représente ici un condensateur C_{in} qui se vide en entrée, et un condensateur équivalent pour un canal C_c qui se remplit au fur et à mesure. Les métriques dérivées T_{max} et V_{max} correspondent aux temps à l'équilibre du système et volume maximal équivalent que le système peut utiliser, respectivement.

Les prédictions analytiques issues de ce modèle ont été comparées à des mesures expérimentales ainsi qu'à des simulations par éléments finis (FEM) réalisées sous COMSOL. Les résultats, présentés à la Figure 6.3, montrent un bon accord entre les différentes approches, avec une erreur maximale de 6,1 %, ce qui est jugé satisfaisant pour les besoins du projet.

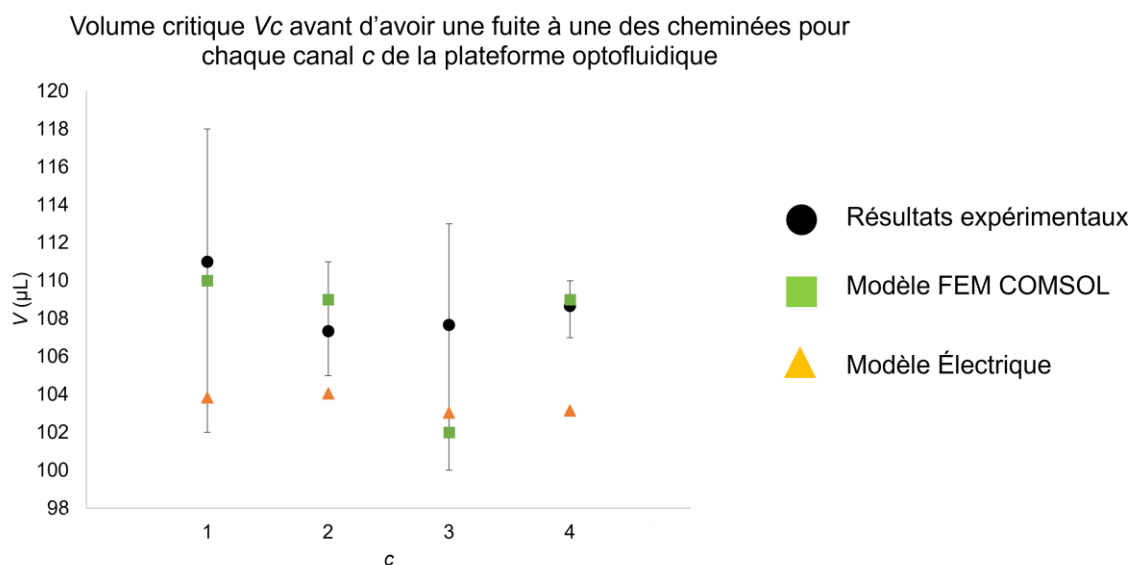


Figure 6.3 : Résultats du modèle mathématique avec les résultats expérimentaux, les simulations COMSOL et les résultats de modélisation par analogie hydraulique-électrique. L'erreur maximale commise est de 6.1%.

6.3 Fabrication

La fabrication de la plateforme optofluidique repose sur des procédés standards de microfabrication en PDMS, adaptés pour intégrer des insertions en aluminium poreux. Les moules négatifs ont été conçus par CAO (CAD en anglais) et fabriqués par impression 3D en résine, permettant de définir la géométrie des canaux et des puits.

La fabrication du dispositif se déroule selon les étapes principales suivantes (Figure 6.4):

- Préparation des puits

Les insertions en aluminium poreux sont positionnées sur les extrusions correspondantes du moule inférieur, de manière à s'intégrer directement à la géométrie finale des puits.

- Préparation du PDMS

Le volume total de PDMS est calculé en incluant un surplus pour compenser les pertes.

Le mélange est préparé selon un ratio volumique de 10:1 (monomère:agent durcissant), puis homogénéisé. Le PDMS est ensuite versé dans les deux moules : le moule inférieur contenant les insertions en aluminium et le moule supérieur définissant les cheminées.

- Dégazage

Les moules remplis sont placés sous vide (dessiccateur) pendant 10 à 15 minutes afin d'éliminer les bulles d'air.

- Polymérisation

Le PDMS est polymérisé à 80 °C pendant environ 60 minutes.

- Préparation et perçage

Après démoulage, les entrées et sorties sont réalisées par poinçonnage si nécessaire, puis les surfaces sont nettoyées afin d'éliminer toute contamination particulière.

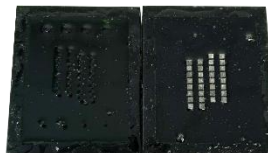
- Activation plasma et assemblage

Les deux couches sont exposées au plasma atmosphérique, puis mises en contact afin de réaliser une liaison irréversible PDMS à PDMS et former le dispositif final.

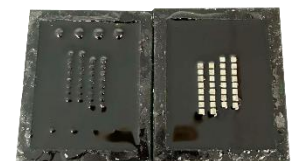
1- Insertion des micropuits en aluminium



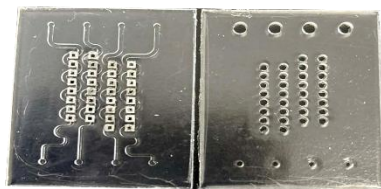
2- Préparation du PDMS pour moulage



3- Dessiccateur pour enlever les bulles



4- Four et démoulage



5- Assemblage au Plasma

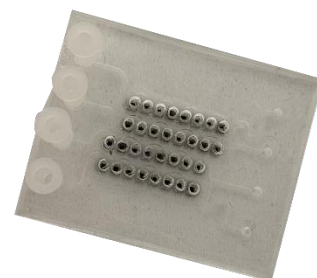


Figure 6.4 : Étapes de fabrication de la plateforme optofluidique en PDMS. Rangée du haut : moules négatifs imprimés en résine et remplis de PDMS avant polymérisation. Rangée du bas: dispositifs en PDMS démoulés, incluant les deux couches et dispositif final après assemblage PDMS à PDMS par activation plasma, intégrant les micropuits et les accès fluidiques.

Une fois assemblée, la plateforme est prête à être utilisée pour des expériences biologiques.

6.4 Validation expérimentale

La validation de la plateforme a été réalisée par l'acquisition de spectres Raman sur des explants MDT issus d'une xénogreffe injectée avec la lignée cellulaire OV1946 (Figure 6.5). L'objectif de cette étape était de vérifier l'absence de contribution spectrale du dispositif et du PDMS.

Les résultats montrent que les spectres acquis dans les puits en aluminium (*Cancer in well*) sont équivalents à ceux obtenus sur un support de référence, le ruban en aluminium (*Cancer on tape*), confirmant l'absence de signal parasite provenant de la plateforme optofluidique. Cette observation valide l'approche de conception visant à éliminer l'interférence du PDMS dans les mesures Raman.

Toutefois, les spectres obtenus ne présentent pas les signatures caractéristiques attendues du tissu tumoral (*Cancer pure*). L'absence de pics distinctifs indique que le signal Raman acquis est insuffisant pour permettre une identification biochimique fiable des échantillons.

Cette limitation ne provient pas du dispositif, mais des conditions de mesure, notamment de la combinaison entre la faible taille des MDTs et la sensibilité limitée de la sonde fibrée utilisée. En effet, les mesures Raman conventionnelles sur tissus tumoraux sont généralement réalisées sur des échantillons macroscopiques, pour lesquels le rapport signal sur bruit est significativement plus élevé.

Ces résultats démontrent que la plateforme optofluidique remplit sa fonction du point de vue instrumental, en supprimant les contributions spectrales parasites, mais qu'elle ne permet pas, dans sa configuration actuelle, l'acquisition de signaux exploitables sur des MDTs.

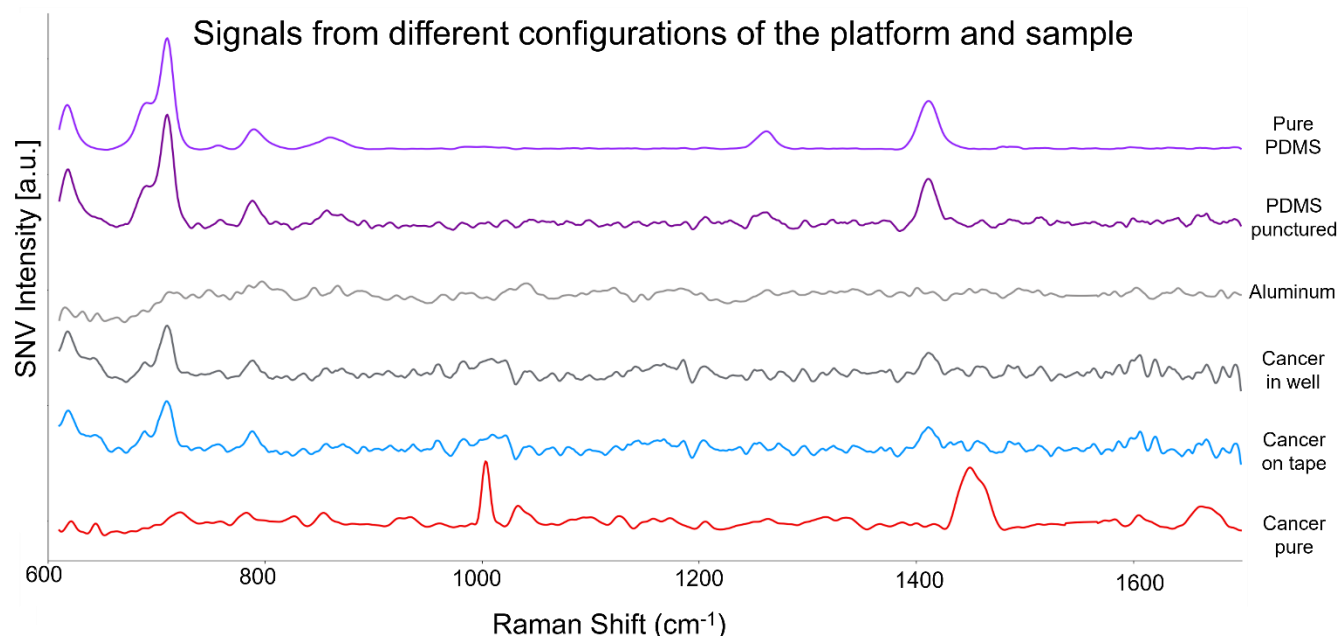


Figure 6.5 : Signatures Raman principalement obtenues en contexte microfluidique. Les matériaux conventionnels (ex. PDMS) introduisent des contributions spectrales qui interfèrent avec les régions d'intérêt de l'échantillon. Les MDTs sur l'aluminium et dans les puits d'aluminium ne présentent pas de signal Raman, sans pics marqués, confirmant l'absence de contribution Raman significative.

Dans ce contexte, deux approches étaient envisageables. La première consistait à entreprendre une optimisation approfondie du système optique, que l'auteur estime à plus d'un an de développement, sans garantie que les signatures biologiques recherchées soient détectables à cette échelle. La seconde consistait à valider en amont la pertinence biologique des signatures Raman à l'aide d'un système plus sensible, indépendant des contraintes microfluidiques.

Compte tenu des contraintes temporelles associées à un projet de maîtrise, la seconde approche a été retenue. Les acquisitions présentées au Chapitre 7 ont ainsi été réalisées à l'aide d'un microspectromètre Raman (Renishaw InVia, Royaume-Uni), permettant des mesures à haute sensibilité sur des volumes tissulaires réduits. Cette stratégie vise à établir la validité biologique de l'approche avant d'envisager une optimisation instrumentale de la plateforme optofluidique.

CHAPITRE 7 VALIDATION D'UNE APPROCHE SPECTRALE RAMAN POUR L'ÉTUDE DES DESTINS CELLULAIRES ET DES RÉPONSES THÉRAPEUTIQUES SUR DES EXPLANTS TUMORAUX MICRODISSÉQUÉS

7.1 Intérêt d'une approche longitudinale non destructive en microfluidique

Les résultats présentés au Chapitre 5 démontrent que la spectroscopie Raman permet d'identifier de manière fiable le contenu tissulaire d'explants tumoraux au niveau de la tranche tout en préservant leur intégrité. Cette capacité à discriminer les compartiments biologiques à partir de signatures biochimiques intrinsèques positionne la technique comme un outil potentiel de caractérisation non destructive en amont des expériences. Toutefois, cette utilisation statique ne représente qu'une facette des possibilités offertes par l'analyse d'explants tumoraux vivants.

Dans un contexte oncologique, l'intérêt principal des explants réside dans leur capacité à servir de modèles biologiques permettant d'étudier des processus dynamiques, tels que la prolifération, la mort cellulaire et la réponse aux traitements de première ligne. Ces phénomènes évoluent dans le temps et nécessitent donc des approches expérimentales capables de suivre un même échantillon de manière longitudinale.

Comme nous l'avons précédemment établi, les approches expérimentales actuelles reposent majoritairement sur des méthodes destructives. Une condition donnée est appliquée à un échantillon, puis celui-ci est fixé et analysé afin d'en extraire une information moléculaire ou morphologique. Cette logique impose l'utilisation d'un échantillon distinct pour chaque condition ou point temporel, limitant l'accès à des mesures appariées, augmentant la variabilité inter-échantillon et compliquant l'interprétation des réponses biologiques, en particulier dans des tissus hétérogènes comme les explants tumoraux dérivés de patients.

L'intégration de méthodes de caractérisation optiques dans les systèmes microfluidiques est décrite dans la littérature, mais reste limitée à pour l'analyse de faibles volumes biologiques à l'aide de techniques telles que la microscopie, la fluorescence ou la spectroscopie^{122,123}. Ces approches permettent d'obtenir une information sensible et spatialement résolue dans des environnements

confinés. Toutefois, elles sont majoritairement développées pour des systèmes simplifiés (cellules isolées, analytes homogènes, fluides) et reposent souvent sur des marquages exogènes ou des conditions optiques contrôlées^{122,123}. Leur transposition à des explants tumoraux vivants, intrinsèquement hétérogènes et optiquement complexes, demeure limitée, voire inexistante.

Comme démontré au chapitre précédent, l'intégration de la spectroscopie Raman dans un cadre optofluidique pose des contraintes instrumentales importantes, notamment liées à la faible intensité du signal à l'échelle microdisséquée et aux limitations des configurations optiques compatibles avec ces dispositifs. Bien que la plateforme optofluidique développée permette de supprimer les contributions spectrales parasites du support, elle ne permet pas, dans sa configuration actuelle, l'acquisition de signaux suffisamment riches pour une caractérisation biochimique fiable des MDTs.

Dans ce contexte, une approche alternative est adoptée dans ce chapitre. Les acquisitions sont réalisées à l'aide d'un microspectromètre Raman à haute sensibilité, permettant de s'affranchir des contraintes instrumentales identifiées précédemment et de se concentrer sur la validité biologique de l'information spectrale. L'objectif premier est de valider la faisabilité de cette approche, encore peu documentée dans la littérature pour des explants tumoraux vivants. Si cette validation s'avère concluante, elle constituera une base solide pour une intégration ultérieure de l'ensemble des composantes au sein d'une plateforme unique combinant microfluidique et spectroscopie Raman.

L'hypothèse centrale de ce chapitre est que la spectroscopie Raman, utilisée dans des conditions optimisées de sensibilité, permet de distinguer des états biologiques associés à différents destins cellulaires au sein d'explants tumoraux vivants, et de suivre leur évolution au cours du temps de manière non destructive. Cette approche vise à établir si les variations spectrales mesurées reflètent des processus biologiques pertinents, tels que la prolifération, l'apoptose ou la réponse à des traitements, indépendamment des contraintes instrumentales liées à l'intégration microfluidique.

7.2 Méthode

7.2.1 Xénogreffes et Patients

Des suspensions cellulaires contenant 5×10^6 cellules OV1946 dans un mélange 1:1 de PBS (311-425-CL, Wisent) et de Matrigel (CACB356237, VWR) ont été injectées dans les flancs de trois souris femelles immunodéficientes NOD.Cg-Rag1tm1MomIl2rgtm1Wjl/SzJ (007799, The

Jackson Laboratory, JAX). Les tumeurs solides ont été prélevées lorsqu'elles atteignaient un volume compris entre 800 et 1000 mm³. Les xénogreffes ont été traitées immédiatement après le prélèvement.

Toutes les procédures animales ont été réalisées conformément aux lignes directrices du CRCHUM pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire et ont été approuvées par le Comité institutionnel de protection des animaux (CIPA).

Les résultats de ce chapitre ont été obtenus à partir d'échantillons biologiques issus d'une seule patiente, acquis conformément à la méthodologie décrite à la section 5.2.1, puis microdisséqués en MDTs.

7.2.2 Génération des MDTs

La microdissection des tranches tissulaires et les procédures associées ont été adaptées de travaux précédemment publiés (PMID: 26659477). Un punch de biopsie de 500 µm (PUN0500, Zivic Instruments) a été utilisé pour produire des micro-explants tumoraux (MDTs), correspondant à des structures tissulaires sphéroïdales d'environ 300 µm de diamètre. Les MDTs ont été maintenus dans une solution de HBSS supplémentée avec 55 µg/mL de gentamicine et 0,6 µg/mL d'amphotéricine B, sans sérum, jusqu'à leur utilisation.

Les MDTs ont ensuite été cultivés dans un milieu OSE (xénogreffes ovariennes) ou Ovarian TumorMACS™ (échantillons de patientes, 130-119-483, Miltenyi Biotec), supplémenté avec 10 % de FBS, 55 µg/mL de gentamicine et 0,6 µg/mL d'amphotéricine B. Tout au long de l'expérience, les échantillons ont été maintenus dans des incubateurs à 37 °C et 5 % de CO₂ afin d'assurer des conditions optimales de culture.

À la fin de l'expérience, les échantillons ont été fixés dans une solution de formol à 10 % (FGY6410 (4L), Chaptec), puis traités selon un protocole de paraffinage précédemment publié afin de générer des blocs de microarrays de tissus microdisséqués (MDTMA) (PMID: 30671574).

7.2.3 Plateforme pour la culture et le traitement des MDTs

Les systèmes microfluidiques utilisés dans ce chapitre correspondent aux dispositifs commerciaux décrits précédemment (MISO Chip, Montréal, QC, Canada), composés de quatre canaux contenant chacun huit puits carrés de 700 µm de largeur et 800 µm de profondeur. Les MDTs y sont introduits

par pipettage et se déposent au fond des puits par sédimentation. Ces dispositifs sont utilisés en remplacement de la plateforme optofluidique développée précédemment, qui ne permet pas dans sa configuration actuelle des acquisitions Raman exploitables sur des MDTs. Ils offrent toutefois un environnement adapté au maintien en culture des explants sur plusieurs jours, permettant la réalisation d'expériences longitudinales.

Lorsqu'une condition arrive à terme et doit être mesurée en Raman, les MDTs sont expulsés du système en appliquant manuellement une pression hydrostatique très importante. Les MDTs sont collectés puis positionnés sous le microspectromètre Renishaw InVia.

7.2.4 Définition des états biologiques de référence

Avant l'application de l'approche longitudinale sur des explants tumoraux humains, une étape d'optimisation biologique a été réalisée sur des modèles murins de xénogreffes OV1946 (laboratoire Mes-Masson). L'objectif était d'identifier des conditions expérimentales permettant d'induire de manière reproductible différents états biologiques (prolifération, apoptose, nécrose), tout en restant compatibles avec les contraintes temporelles des acquisitions Raman. Cette étape vise à établir un référentiel biologique robuste avant l'analyse sur échantillons humains.

Dans les tissus tridimensionnels, les dynamiques biologiques diffèrent des cultures 2D en raison d'effets de diffusion et d'hétérogénéité. Par ailleurs, chaque condition expérimentale nécessitant environ 1h30 d'acquisition, le nombre de conditions testables est limité. L'optimisation visait donc à sélectionner un ensemble restreint de conditions robustes, représentatives et temporellement compatibles. Les résultats détaillés de cette optimisation sont présentés en Annexe D, Figure 2 à 6.

7.2.5 Induction des destins cellulaires

Trois états biologiques principaux ont été étudiés : prolifération, apoptose et nécrose.

La prolifération constitue le contrôle positif, correspondant à un état tumoral basal. L'induction a été validée par immunomarquage au Ki-67. Les explants ont été maintenus en culture dans un milieu TumorMACS supplémenté avec 10% FBS, et des travaux préliminaires ont montré qu'un délai de trois jours après microdissection permet un retour à un état prolifératif stable (Annexe D, Figure 2-3). Les acquisitions spectrales ont ainsi été réalisées aux jours 1, 4, 5, 6 et 7.

L'apoptose a été induite à l'aide de la staurosporine à une concentration de 1 μM pendant 24 heures, condition sélectionnée pour sa robustesse et sa compatibilité avec le protocole expérimental (Annexe D, Figure 4). L'induction a été validée par immunomarquage de la caspase-3 clivée (CC3).

La nécrose a été induite par exposition au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une concentration de 10 mM pendant 24 heures. Cette condition a été retenue pour sa capacité à induire une mort cellulaire non programmée de manière reproductible. La caractérisation repose principalement sur des critères morphologiques (H&E, DAPI) et l'absence de marquage spécifique (Annexe D, Figure 5).

7.2.6 Exposition aux traitements thérapeutiques

La réponse aux traitements a été étudiée à travers des expositions à la radiothérapie et à la chimiothérapie, en considérant des paramètres de dose et de dynamique temporelle.

La radiothérapie a été appliquée selon des doses de fractionnement cliniquement pertinentes (2 Gy et 8 Gy), avec des mesures à 24, 48 et 96 heures. Une validation précoce des dommages à l'ADN a été réalisée à 45 minutes post-irradiation par marquage de $\gamma\text{-H2AX}$. Les temps de 24 et 48 heures ont été retenus pour les analyses principales sur patient (Annexe D, Figure 6-7).

La chimiothérapie repose sur une combinaison carboplatine-paclitaxel, correspondant au standard thérapeutique en oncologie ovarienne¹²⁴. Les explants ont été exposés à une dose 1X (135 μM carboplatine, 40 nM paclitaxel) ainsi qu'à une dose 2X (270 μM carboplatine, 80 nM paclitaxel), pendant 16 heures, suivies d'acquisitions à 24 et 48 heures afin de capturer la réponse retardée au traitement. Cette méthode a précédemment été optimisée et est actuellement utilisée dans les laboratoires Gervais et Mes-Masson¹²⁵. Ainsi, seules les doses utilisées sont reprises ici.

7.2.7 Acquisition spectroscopique Raman

Les acquisitions Raman ont été réalisées à l'aide d'un microspectromètre Renishaw InVia (Renishaw, Royaume-Uni) équipé d'un laser à 785 nm. La puissance d'excitation au point focal était de 40 mW. Les spectres ont été acquis dans une plage de 600 à 1700 cm^{-1} , avec une résolution spectrale de 0.3 à 1 cm^{-1} .

Chaque spectre correspond à la moyenne de 10 accumulations, avec un temps d'exposition de 1000 ms. Le point focal (approx. 40 x 40 μm) couvrant une fraction limitée de l'explant, deux

acquisitions ont été réalisées par échantillon, correspondant à environ 3 % de sa surface. Un nombre plus élevé de points n'était pas compatible avec le maintien de la viabilité des échantillons sur la durée des expériences.

Chaque MDT était sorti de la plateforme conformément à la méthode décrite à la section 7.2.3 et mis sur le ruban d'aluminium. Les MDTs sont également rincés avec du milieu TumorMACS frais afin de minimiser toute contribution chimique résiduelle.

7.2.8 Traitement du signal et contrôle de qualité

Les spectres Raman ont été traités à travers la librairie ORPL, calibrés avec silicium selon le standard du microspectromètre, puis normalisés par la méthode *Standard Normal Variate* (SNV) afin de réduire les effets de diffusion et de variations d'intensité entre spectres.

Un facteur de qualité spectrale (QF), compris entre 0 et 1, a été calculé pour chaque spectre afin de sélectionner les spectres qui ne fausseraient pas les résultats. Ce facteur est défini comme la moyenne signée du carré des intensités normalisées :

$$QF = \frac{1}{N} \sum_i \text{sgn}(r_i) \cdot r_i^2$$

où r_i correspond aux intensités du spectre normalisé.

Les spectres dominés par le bruit présentent des valeurs de QF proches de 0, tandis que les spectres contenant des signatures Raman reproductibles présentent des valeurs plus élevées. Un seuil de QF > 0.4 a été appliqué afin de sélectionner les spectres utilisés.

7.2.9 Analyse histologique et par immunofluorescence

Les analyses ont été effectuées par histopathologie et immunofluorescence. Les coupes de 4 μm ont été traitées à l'aide d'un système automatisé (Discovery Ultra, Ventana). Après récupération antigénique, les anticorps primaires ont été incubés pendant 60 minutes à 37 °C, suivis des anticorps secondaires fluorescents. Les marquages pertinents sont identifiés dans chacune des sections de méthode associées.

Les lames ont été numérisées à l'aide d'un microscope Olympus BX61, puis analysées avec le logiciel VisiomorphDP (VisioPharm) à l'aide de méthodes de seuillage et de calculs de ratio d'aires. L'ensemble des résultats statistiques découlant des images histologiques et présentés sur des histogrammes sont des ANOVA à double effet et réalisés avec GraphPad Prism (version 10.3, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

7.3 Résultats humains

Les résultats histologiques sont présentés graphiquement une seule fois dans cette section pour les mesures de destin cellulaire afin d'en faciliter la lecture. L'ensemble des données et des figures est toutefois disponible sur demande sur le Nextcloud du groupe LumedLab.

7.3.1 Destins cellulaires

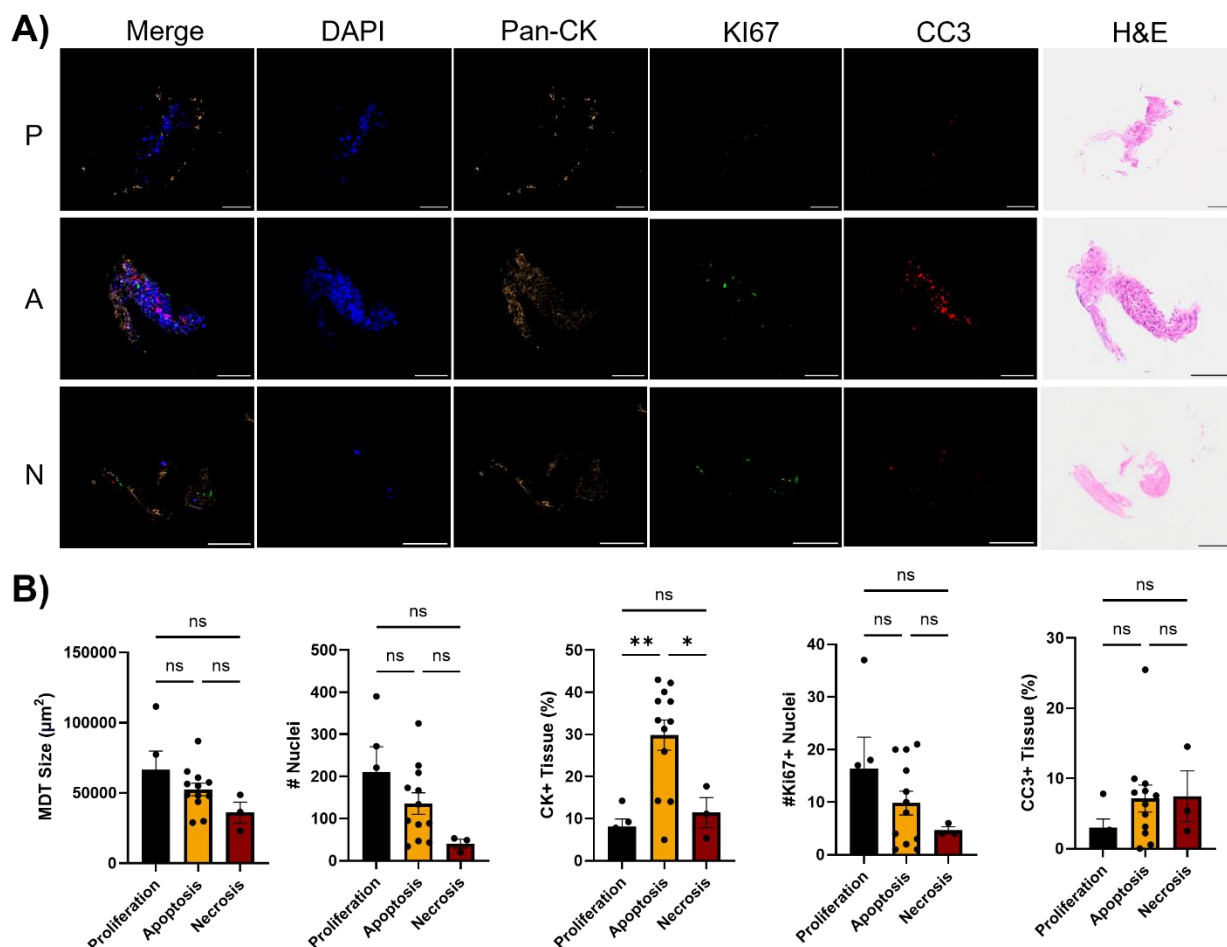
La première expérience cherchait à identifier si nous pouvions différencier un tissu prolifératif d'un tissu apoptotique d'un tissu nécrotique. Un traitement clinique induit une panoplie de phénomènes, donc nous ne pouvons pas associer une signature d'échantillon traité à un destin cellulaire. Ici, c'est possible en raison du choix pharmacologique pour l'induction des destins. La Figure 7.1 présente les résultats histologiques de l'expérience.

Les états biologiques de prolifération, d'apoptose et de nécrose ont été comparés à l'aide de marqueurs histologiques et par immunofluorescence. Pour la suite de l'analyse, la condition proliférative est considérée comme référence.

Le marquage Ki-67 montre une tendance à la diminution dans les conditions d'apoptose et de nécrose par rapport à la prolifération, bien que ces différences ne soient pas statistiquement significatives. De manière similaire, le marquage CC3, indicateur d'apoptose, présente une variabilité importante. Néanmoins, une tendance vers une augmentation de l'expression du CC3 dans les conditions apoptotique et nécrotique est observée en comparaison à la condition proliférative.

En revanche, la proportion de tissu épithélial (Pan-CK+) est significativement augmentée dans la condition apoptotique par rapport à la prolifération et à la nécrose ($p < 0.05-0.01$), suggérant que la qualité du tissu apoptotique et nécrotique était meilleure que le tissu prolifératif au départ de l'expérience.

Le nombre total de noyaux montre une tendance à la diminution dans les conditions traitées, particulièrement en nécrose, bien que cette variation ne soit pas significative. La taille des MDTs demeure quant à elle comparable entre les conditions, indiquant une conservation globale de la structure tissulaire. Dans l'ensemble, malgré une variabilité inter-échantillon importante, ces résultats indiquent que les différentes conditions expérimentales induisent des réponses



biologiques distinctes, permettant de définir des états cellulaires différenciés pour les analyses subséquentes.

Figure 7.1: Comparaison des états biologiques de prolifération, d'apoptose et de nécrose dans des explants tumoraux à l'aide de marqueurs histologiques et par immunofluorescence. Les graphiques présentent le nombre de noyaux Ki-67 positifs (#Ki67+), la fraction d'aire apoptotique (CC3+), la proportion de tissu épithélial (Pan-CK+), le nombre total de noyaux ainsi que la taille des MDTs. Le nombre total de noyaux tend à diminuer dans les conditions traitées, particulièrement en nécrose, tandis que la taille des MDTs reste stable. Les points représentent des échantillons individuels et les barres indiquent la moyenne $\pm$ écart-type. Les barres d'échelle sont

100 microns. Les différences statistiques ont été évaluées par ANOVA à double effet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns : non significatif).

Les spectres Raman moyens des explants prolifératifs, apoptotiques et nécrotiques sont présentés à la Figure 7.2. Globalement, les trois conditions présentent des profils spectraux similaires, avec des bandes caractéristiques communes associées aux composantes biochimiques des tissus tumoraux.

Malgré cette similarité globale, des différences d'intensité sont observées dans certaines régions spectrales. En particulier, des variations sont visibles autour des bandes situées approximativement à 850 à 900 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} , ainsi que dans les régions associées aux vibrations CH autour de 1454 cm^{-1} et dans la région amide I (approx. 1656 cm^{-1}). Ces différences restent modérées et s'inscrivent principalement dans des variations d'amplitude plutôt que dans l'apparition ou la disparition de bandes spécifiques. Des différences plus localisées sont également observées dans la région intermédiaire autour de 1300 , 1345 et 1375 cm^{-1} , suggérant des variations dans les contributions protéiques et lipidiques entre les conditions, en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature pour des cultures cellulaires 2D^{126,127}.

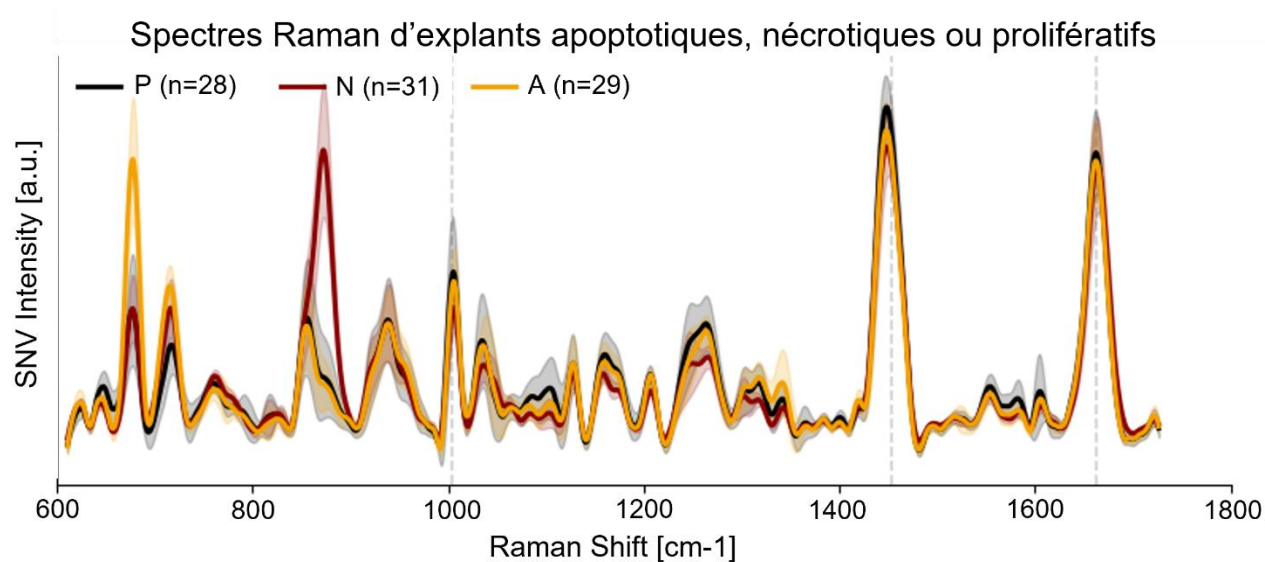


Figure 7.2: Spectres Raman moyens ($\pm$ écart-type) des explants tumoraux en conditions proliférative (P, noir, $n = 28$), apoptotique (A, jaune, $n = 29$) et nécrotique (N, rouge, $n = 31$), après normalisation SNV. Les trois conditions présentent des profils spectraux globalement similaires, avec des différences d'intensité observées dans plusieurs régions, notamment autour de 850 - 900 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} , 1300 - 1375 cm^{-1} , 1454 cm^{-1} et 1656 cm^{-1} .

La condition nécrotique présente notamment une intensité accrue dans certaines bandes intermédiaires, tandis que les conditions proliférative et apoptotique montrent des profils plus proches l'un de l'autre sur l'ensemble du spectre. L'écart-type associé à chaque condition indique toutefois une variabilité intragroupe importante, cohérente avec les observations histologiques.

Afin de quantifier les différences spectrales observées entre les conditions, une analyse statistique a été réalisée sur des bandes Raman sélectionnées à la Figure 7.3.

Chaque ligne correspond à une comparaison entre deux conditions biologiques, indiquées à gauche (prolifération, apoptose et nécrose). Chaque colonne correspond à une bande Raman spécifique (en cm^{-1}).

Chaque cellule représente la différence moyenne des intensités SNV entre les deux conditions pour une bande donnée. La valeur numérique indique l'amplitude et le signe de cette différence. Les astérisques associés indiquent le niveau de significativité statistique obtenu par une ANOVA à deux facteurs.

Des différences significatives sont observées entre les états biologiques, en particulier dans certaines régions spectrales clés. La comparaison entre prolifération et nécrose (P vs N) met en évidence des variations marquées sur plusieurs bandes, notamment autour de 873 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , 1265 cm^{-1} , 1320 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} et 1447 cm^{-1} , suggérant des modifications biochimiques importantes entre ces deux états.

La comparaison entre apoptose et nécrose (A vs N) révèle également des différences significatives sur plusieurs bandes, incluant notamment 873 cm^{-1} et la région $1004\text{-}1350 \text{ cm}^{-1}$, indiquant que ces deux états présentent des signatures spectrales distinctes malgré certaines similarités globales.

En revanche, la comparaison entre prolifération et apoptose (P vs A) montre des différences plus limitées, avec un nombre restreint de bandes significatives, suggérant une plus grande proximité spectrale entre ces deux états.

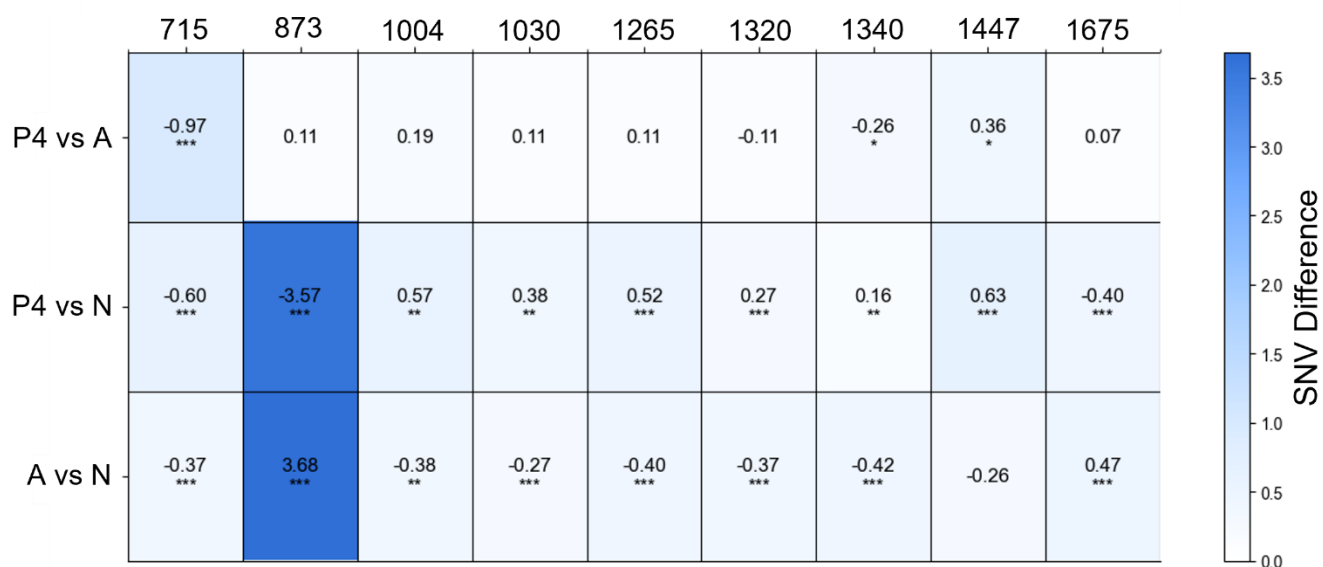


Figure 7.3 : Analyse statistique des différences spectrales entre états biologiques. Carte de chaleur représentant les différences spectrales moyennes entre les conditions proliférative (P), apoptotique (A) et nécrotique (N) pour des bandes Raman sélectionnées (715, 873, 1004, 1030, 1265, 1320, 1340, 1447 et 1675 cm^{-1}). Les valeurs indiquent les différences moyennes entre conditions, tandis que l'intensité de la couleur reflète l'amplitude de la différence (bleu foncé = différence plus élevée). Les astérisques indiquent le niveau de significativité statistique (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Des différences significatives sont observées principalement entre les conditions proliférative et nécrotique, ainsi qu'entre apoptose et nécrose, tandis que la comparaison entre prolifération et apoptose présente des variations plus limitées.

Message clé de ces résultats :

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent qu'il est possible de différencier un tissu qui est prolifératif d'un tissu nécrotique d'un tissu apoptotique par spectroscopie Raman.

7.3.2 Réponse à la chimiothérapie

La deuxième expérience cherchait à identifier une réponse à la dose et au temps de repos à la suite d'un traitement par chimiothérapie.

Les spectres moyens présentent des profils globalement similaires entre les différentes conditions, avec des bandes caractéristiques conservées sur l'ensemble du spectre. Toutefois, des variations d'intensité sont observées dans certaines régions spécifiques, suggérant une modulation biochimique induite par le traitement.

Une distinction plus marquée est généralement observée entre les échantillons prolifératifs et les conditions traitées, particulièrement dans les régions autour de 675 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} , ainsi que dans les bandes associées aux vibrations CH et amide I (1454 cm^{-1} et 1656 cm^{-1}). Ces différences sont cohérentes avec les variations observées histologiquement, notamment la réduction de la prolifération et les modifications du compartiment épithélial (Document Nextcloud, Diapositive 6).

L'analyse statistique confirme ces observations, avec des différences significatives entre les conditions prolifératives et les échantillons traités, principalement à 24 heures. La région autour de 675 cm^{-1} apparaît particulièrement discriminante, montrant des différences significatives entre les conditions traitées et le contrôle, indépendamment de la dose.

En revanche, les comparaisons entre les doses (1X vs 2X, nommés C1 et C2) et entre les temps (24 h vs 48 h, nommés J5 et J6) révèlent des différences plus limitées et moins systématiques. Les variations spectrales associées à l'augmentation de dose restent modestes, avec peu de bandes présentant des différences significatives robustes entre les deux niveaux d'exposition. Une différenciation plus marquée entre les doses est toutefois observée à 48 heures, suggérant que ce

temps pourrait mieux capturer les effets dose en fonction du traitement. Un exemple de ces résultats est présenté à la Figure 7.4

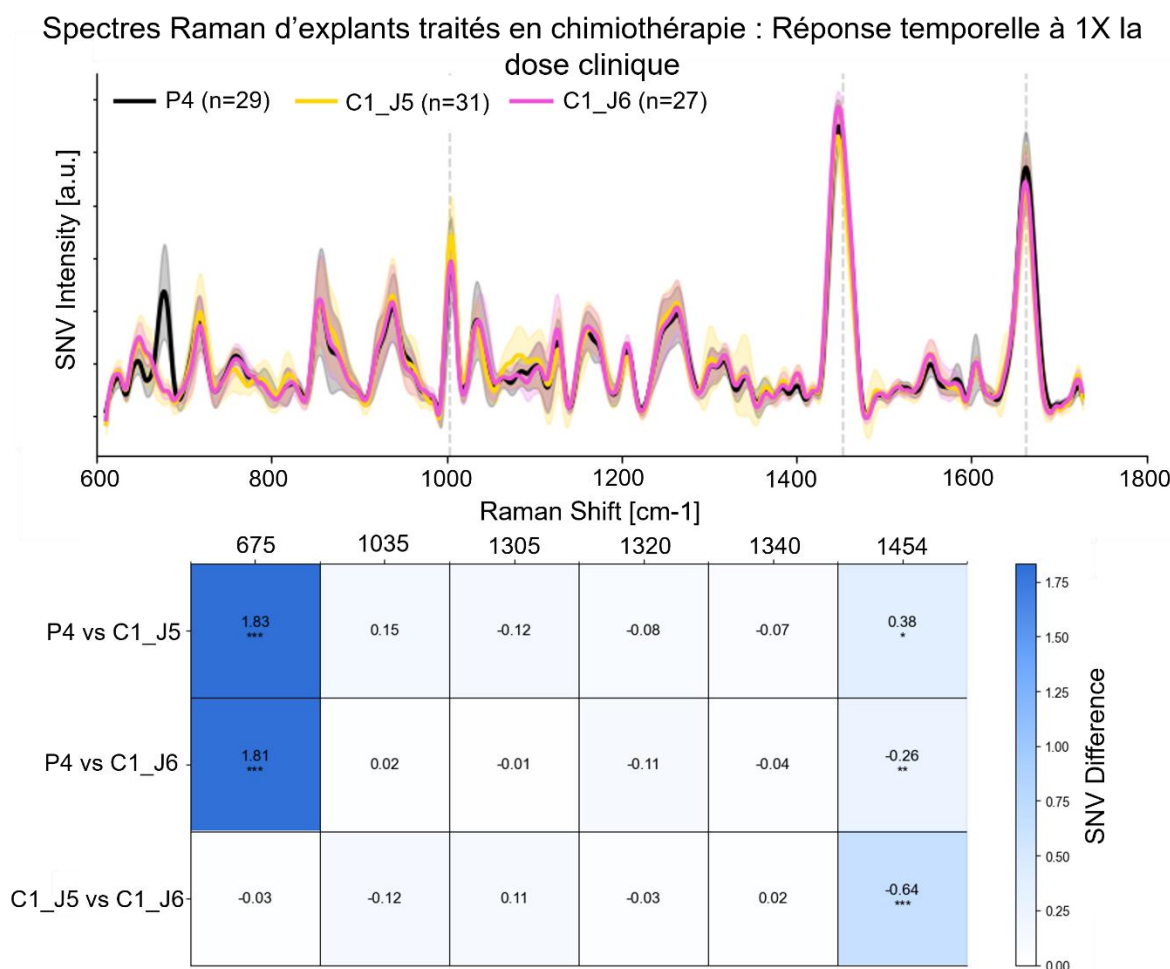


Figure 7.4 : Signatures Raman de la réponse à la chimiothérapie. Spectres Raman moyens ($\pm$ écart-type) des explants tumoraux prolifératifs (P4, $n = 29$) et traités à la chimiothérapie à dose clinique (C1_J5, $n=31$) et (C2_J5, $n = 27$) après normalisation SNV. Les profils spectraux sont globalement similaires, avec des variations d'intensité observées dans certaines régions, notamment autour de 675 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} et 1450 cm^{-1} . La carte de chaleur présente les différences spectrales moyennes entre les conditions pour des bandes sélectionnées. La région autour de 675 cm^{-1} apparaît comme la plus discriminante entre les conditions traitées et prolifératives, avec des différences significatives indépendamment du temps. Les autres bandes montrent des variations plus modestes et moins systématiques. Les astérisques indiquent le niveau de significativité statistique (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

De manière similaire, les différences entre 24 et 48 heures demeurent globalement faibles, indiquant une stabilisation rapide de la réponse spectrale.

Message clé de ces résultats :

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent qu'il est possible de différencier un explant traité ou non en chimiothérapie, mais plus de travail est requis pour confirmer la possibilité de discriminer entre les doses et les temps de repos.

7.3.3 Réponse à la radiothérapie

La troisième expérience cherchait à identifier encore une fois une réponse à la dose et au temps de repos lors d'un traitement par radiothérapie. Les signatures Raman associées à la réponse à la radiothérapie ont été analysées afin d'évaluer la capacité à distinguer les effets de dose et de temps.

Les spectres moyens présentent des profils globalement similaires entre les conditions, avec des bandes caractéristiques conservées sur l'ensemble du spectre. Néanmoins, des variations d'intensité sont observées dans certaines régions spécifiques, suggérant une modulation biochimique induite par l'irradiation.

Une distinction est observée entre les échantillons prolifératifs et les conditions irradiées, notamment dans la région autour de 675 cm^{-1} , qui apparaît comme la plus discriminante. Cette bande présente des différences significatives entre les conditions irradiées (2 Gy et 8 Gy) et le contrôle, confirmant une altération mesurable du signal Raman après irradiation. Ces différences sont cohérentes avec les variations observées histologiquement, notamment la réduction de la prolifération et les l'augmentation de l'expression de CC3 (Document Nextcloud, Diapositive 3).

D'autres variations plus modestes sont observées dans certaines régions du spectre, incluant les bandes autour de $940\text{ à }1004\text{ cm}^{-1}$ $1300\text{ à }1375\text{ cm}^{-1}$, ainsi que dans les régions associées aux vibrations CH (1454 cm^{-1}) et amide I (1656 cm^{-1}). Toutefois, ces différences restent limitées et moins systématiques. L'analyse statistique confirme que les principales différences spectrales sont observées entre les conditions prolifératives et les conditions irradiées, avec peu de discrimination robuste entre les doses (2 Gy vs 8 Gy), comme illustré à la Figure 7.5. De même, les comparaisons entre les temps d'acquisition (24 h vs 48 h, nommés J4 et J5) montrent des variations faibles, suggérant une réponse spectrale relativement stable sur la période étudiée. Une légère

différenciation entre les doses est observable dans certaines bandes à 48 heures, mais ces effets demeurent modestes et non généralisés à l'ensemble du spectre.

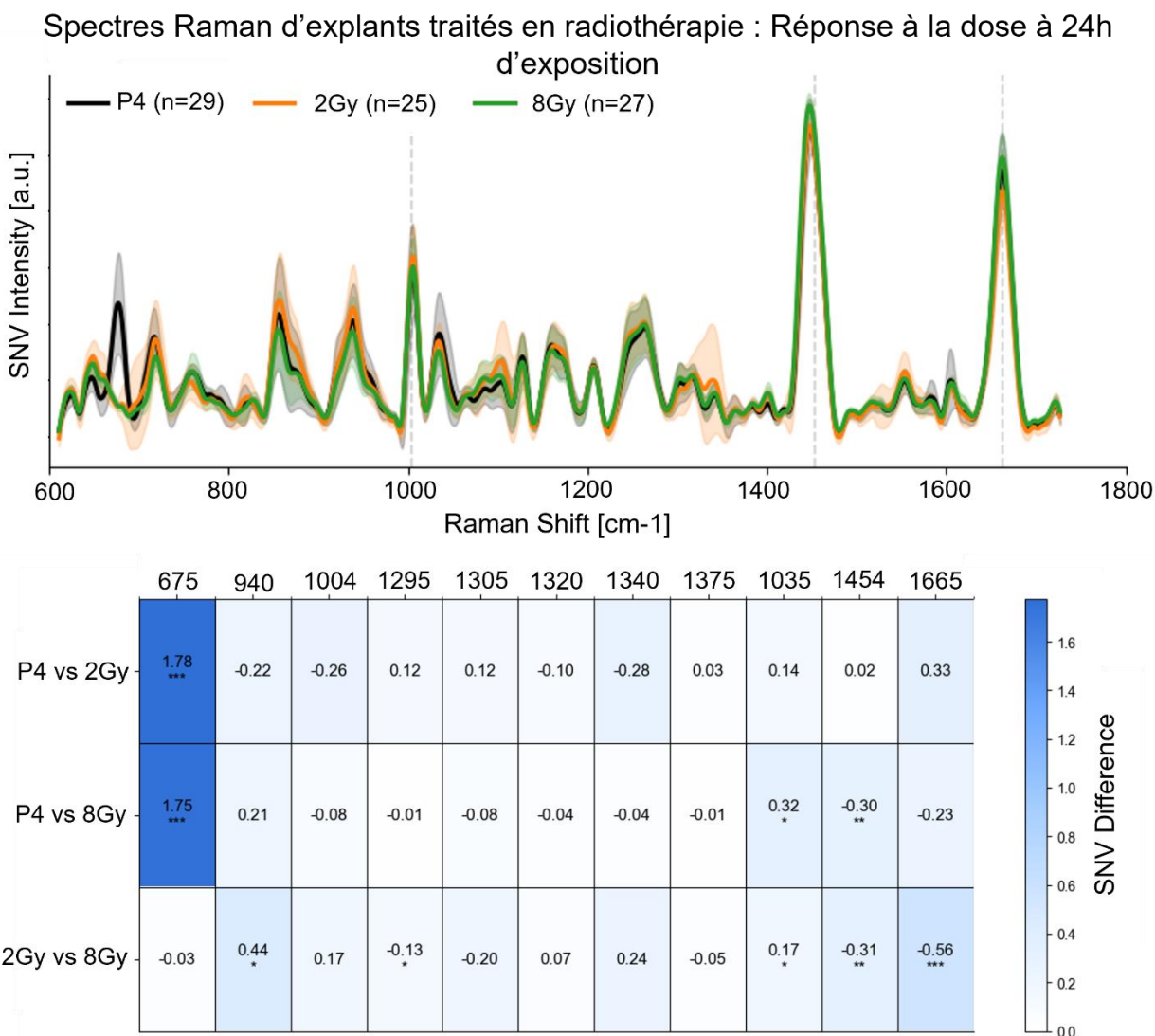


Figure 7.5 : Signatures Raman de la réponse à la radiothérapie en fonction de la dose. Spectres Raman moyens ($\pm$ écart-type) des explants tumoraux prolifératifs (P4, $n = 29$) et irradiés à (2 Gy, $n = 25$) et (8 Gy, $n=27$), après normalisation SNV. Les profils spectraux demeurent globalement similaires entre les conditions, avec des variations d'intensité observées dans certaines régions du spectre.

La carte de chaleur présente les différences spectrales moyennes entre les conditions pour des bandes sélectionnées. La région autour de 675 cm^{-1} apparaît comme la plus discriminante entre les conditions irradiées et prolifératives, avec des différences significatives pour les deux doses. Les autres bandes montrent des variations plus modestes, avec peu de différences systématiques entre 2 Gy et 8 Gy. Les astérisques indiquent le niveau de significativité statistique (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Message clé de ces résultats :

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent qu'il est possible de différencier un explant traité ou non en radiothérapie à des doses de fractionnement clinique, mais plus de travail est requis pour confirmer la possibilité de discriminer entre les doses et les temps de repos.

7.3.4 Prolifération des explants

La dernière expérience visait à associer une signature Raman à un état prolifératif en suivant des explants tumoraux au cours du temps (jours 1, 4, 5, 6 et 7, nommés P1, P4, P5, P6 et P7 respectivement) et en comparant leurs signatures spectrales. Chaque acquisition Raman a été corrélée à une analyse histologique afin d'assurer une validation indépendante de l'état biologique. Le jour 7 fut ignoré, car il présentait une contamination bactérienne lors des analyses histologiques.

L'état prolifératif des explants a été évalué à l'aide des marqueurs Ki-67 et CC3, ainsi que par des mesures de contenu cellulaire et de fraction épithéliale. Les résultats histologiques démontrent une variabilité importante entre les échantillons, sans tendance temporelle claire ni différence significative pour les marqueurs de prolifération et d'apoptose (Document Nextcloud, Diapositive 7). De plus, les mesures de prolifération semblent décroître plutôt qu'augmenter dans le temps. Le nombre total de noyaux diminue aussi significativement après la mise en culture, suggérant une perte cellulaire globale, alors que la taille des MDTs demeure relativement stable, indiquant une conservation de la structure tissulaire. Une augmentation ponctuelle de la fraction épithéliale (Pan-CK+) est observée à certains temps, sans suivre une dynamique cohérente. Ces résultats ne permettent pas d'identifier un état prolifératif reproductible au cours du temps.

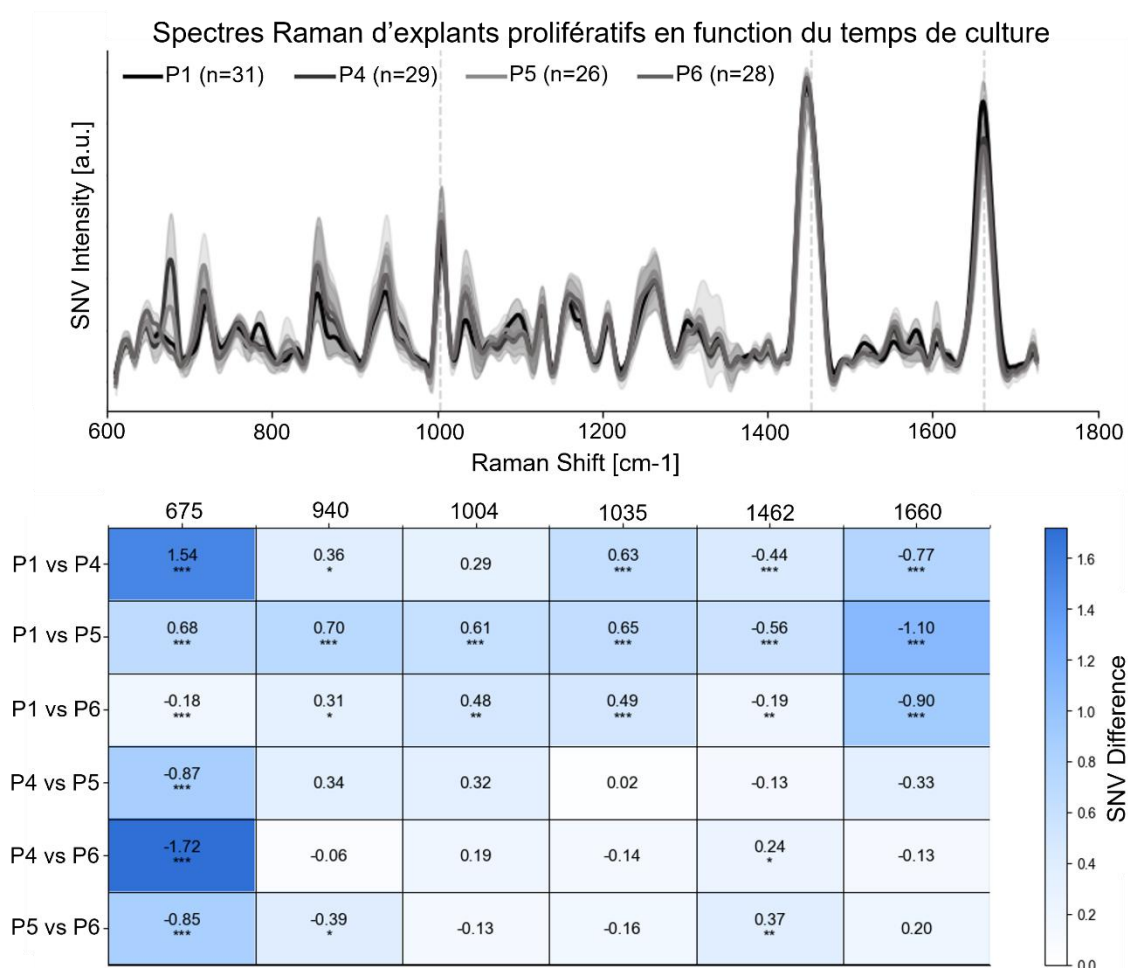


Figure 7.6 : Signatures Raman en fonction du temps de culture (condition proliférative). Spectres Raman moyens ($\pm$ écart-type) des explants tumoraux en condition proliférative aux jours 1, 4, 5 et 6, après normalisation SNV. Les profils spectraux sont globalement similaires entre les temps de culture, sans variation marquée dans l'ensemble du spectre. La carte de chaleur présente les différences spectrales moyennes entre les temps pour des bandes sélectionnées. Certaines variations sont observées, notamment autour de 675 cm^{-1} , 940 cm^{-1} et 1035 cm^{-1} , ainsi que dans les régions associées aux vibrations CH (1460 cm^{-1}) et amide I (1660 cm^{-1}). Toutefois, ces différences ne suivent pas de tendance temporelle cohérente. Ces résultats suggèrent l'absence de dynamique spectrale reproductible associée à la prolifération dans les conditions expérimentales étudiées, en accord avec les observations histologiques. Les astérisques indiquent le niveau de significativité statistique (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Une analyse a posteriori de la qualité du tissu initial révèle que les échantillons utilisés présentaient

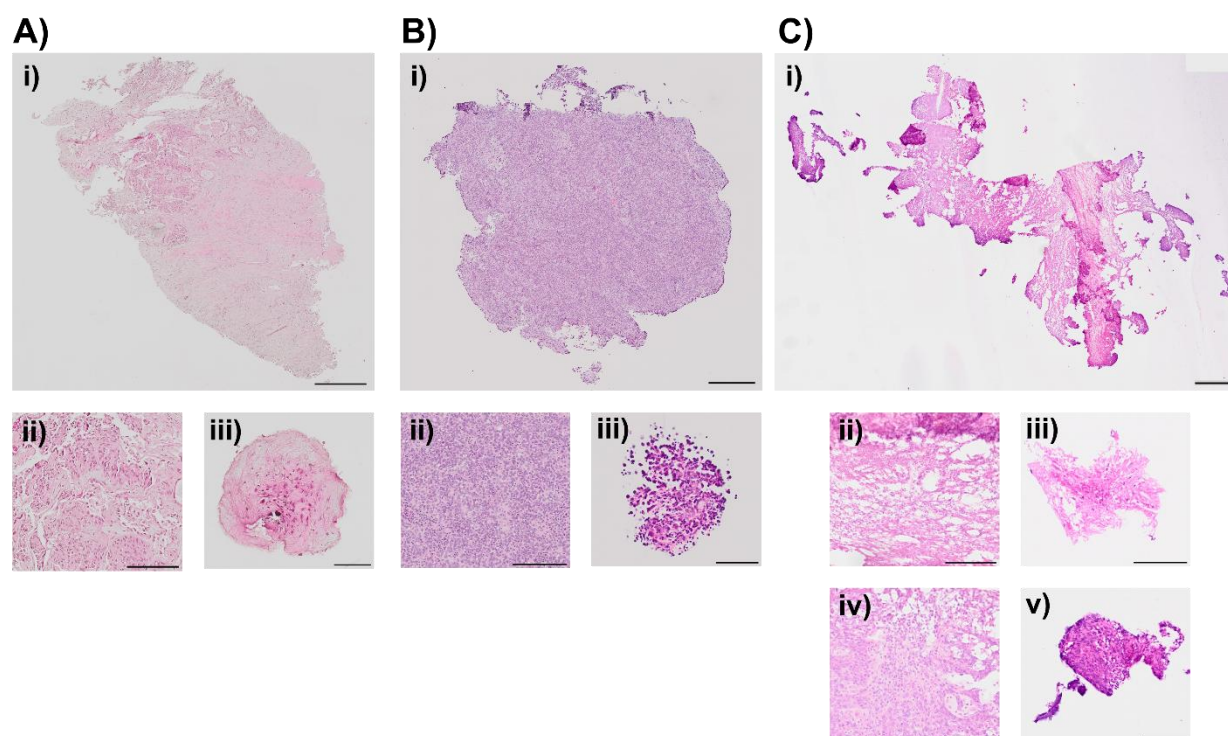


Figure 7.7 : Analyse histologique de la qualité du tissu primaire utilisé pour les expériences de prolifération. (A) Exemple de tissu présentant une forte composante stromale et des régions nécrotiques. (i) Vue macroscopique de la tranche tissulaire, (ii) zoom sur une région représentative montrant une faible cellularité et une organisation stromale, et (iii) MDT généré à partir de ce tissu, présentant une faible densité cellulaire. (B) Exemple de tissu tumoral de bonne qualité, caractérisé par une forte cellularité et une organisation épithéliale homogène. (i) Vue macroscopique, (ii) zoom sur une région représentative, et (iii) MDT correspondant. (C) Tissu utilisé dans les expériences de prolifération de ce mémoire. Bien que macroscopiquement similaire à un tissu tumoral viable (i), l'analyse histologique révèle une hétérogénéité importante avec la présence de régions stromales et nécrotiques (ii, iv), conduisant à la génération de MDTs de qualité variable (iii, v). Les barres d'échelle sont de 500 microns (Ai, Bi, Ci), de 200 microns (Aii, Bii, Cii) et 100 microns (Aiii, Biii, Ciii).

La Figure 7.7 présente cette vérification, illustrant la variabilité du tissu primaire utilisé ainsi que son impact sur les MDTs générés. Ces observations indiquent que l'absence de dynamique proliférative mesurable est principalement liée à la qualité et à la composition initiale du tissu, plutôt qu'à une limitation de l'approche expérimentale.

Message clé de ces résultats :

Dans l'ensemble, ces résultats empêchent de conclure sur la capacité de la spectroscopie Raman à étudier un explant prolifératif dans le temps, notamment en raison de la qualité du tissu utilisé.

7.4 Discussion

Les résultats de ce chapitre montrent que la spectroscopie Raman a le potentiel de détecter des variations spectrales associées à différents états biologiques au sein d'explants tumoraux. En particulier, la distinction entre un état prolifératif et des conditions traitées est observée de manière reproductible, tant pour la chimiothérapie que pour la radiothérapie. Cette capacité à différencier un état basal d'un état perturbé est cohérente avec les changements biochimiques attendus, notamment au niveau des protéines, lipides et acides nucléiques, déjà rapportés dans la littérature en spectroscopie Raman sur modèles cellulaires et tissulaires.

L'analyse des destins cellulaires constitue un point clé de ces résultats. Les différences spectrales observées entre prolifération, apoptose et nécrose confirment que la spectroscopie Raman est sensible à des états biologiques distincts, malgré une variabilité intragroupe importante. La séparation plus marquée entre prolifération et nécrose, comparativement à la distinction de prolifération à apoptose, est également cohérente avec la nature des processus biologiques impliqués, la nécrose étant associée à des altérations structurelles et biochimiques plus importantes.

La réponse aux traitements met en évidence des tendances similaires. Pour la chimiothérapie comme pour la radiothérapie, les différences spectrales les plus marquées sont observées entre les conditions prolifératives et les conditions traitées, alors que la discrimination fine entre doses et temps reste limitée. Ces observations suggèrent que la majorité des modifications biochimiques détectables par Raman surviennent rapidement après traitement, suivies d'une phase de stabilisation, ce qui est en accord avec des études précédentes montrant une réponse précoce des tissus tumoraux aux stress cytotoxiques.

Cependant, plusieurs limites doivent être considérées dans l'interprétation de ces résultats. La variabilité intra-échantillon est importante et reflète directement l'hétérogénéité des explants tumoraux. Ce phénomène est particulièrement visible dans l'expérience de prolifération, où aucune dynamique temporelle reproductible n'a pu être identifiée. L'analyse a posteriori montre que cette

absence de tendance est principalement liée à la qualité du tissu initial, incluant la présence de composantes stromales et nécrotiques dès la préparation. De plus, toutes les analyses statistiques étant sur des résultats préliminaires, aucun test de correction comme Bonferroni-Holm ou Tukey's n'a été effectué sur les *p-values*, ce qui devra éventuellement être implémenté.

Le résultat de prolifération met en évidence un point critique pour l'utilisation d'explants tumoraux : la composition initiale du tissu influence fortement les mesures biologiques et spectroscopiques. Sans contrôle de qualité préalable, cette hétérogénéité peut masquer les dynamiques biologiques recherchées. Cette observation est cohérente avec les travaux présentés au Chapitre 5, où l'identification non destructive du contenu tissulaire apparaît comme une étape essentielle pour la sélection des échantillons.

Enfin, bien que les résultats démontrent la faisabilité de l'approche, ils restent exploratoires. Le nombre limité de patientes et l'absence de conditions de référence parfaitement contrôlées limitent la portée des conclusions. Néanmoins, l'ensemble des observations indique que la spectroscopie Raman est capable de capturer des variations biochimiques pertinentes dans des explants tumoraux vivants, et constitue une base prometteuse pour le développement d'approches longitudinales non destructives.

CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE

Il y a deux ans, la question centrale de ce projet était simple : est-il possible de caractériser et de suivre de manière non destructive la réponse de tissus tumoraux vivants à l'aide de la spectroscopie Raman ? À ce stade, peu d'information était disponible et les approches existantes n'étaient pas adaptées à des tissus tumoraux complexes.

Les travaux présentés dans ce mémoire permettent aujourd'hui d'apporter des éléments de réponse. Il est possible d'identifier un contenu tumoral à partir de tranches de tissu, et une information biologique exploitable semble accessible à partir de tissus tumoraux vivants. La capacité à distinguer différents états biologiques et certaines réponses à des traitements a été explorée et comparée avec le standard clinique, soit l'histopathologie. L'approche est donc réalisable, mais sous certaines conditions.

Le Chapitre 4 a permis le développement du premier outil conçu spécifiquement pour l'étude d'explants tumoraux vivants en contexte optofluidique et microfluidique par spectroscopie Raman. La plateforme développée permet des acquisitions automatisées et reproductibles sur des tissus vivants et constitue une infrastructure expérimentale essentielle pour les travaux présentés dans ce mémoire. Toutefois, le système ne permet pas encore des acquisitions fiables sur des MDTs en raison d'un signal Raman insuffisant avec la sonde actuellement utilisée.

Le Chapitre 5 a démontré qu'il est possible de distinguer de manière non destructive différents compartiments biologiques au sein du tissu tumoral. Cette capacité de caractérisation tissulaire constitue un élément central du projet puisqu'elle permet d'envisager une sélection préalable des explants avant les expériences longitudinales. Les résultats montrent également que la qualité des résultats fonctionnels dépend directement de la composition initiale du tissu. Sans caractérisation préalable, l'hétérogénéité des explants introduit une variabilité importante pouvant masquer les dynamiques biologiques recherchées. Toutefois, cette approche n'a pas encore été transposée directement aux MDTs en raison de limitations liées au volume de tissu et au signal optique.

Le Chapitre 6 a permis de proposer un premier prototype de plateforme optofluidique destinée à l'étude d'explants microdisséqués vivants tout en identifiant les limitations actuelles du système. Malgré une réduction efficace du bruit de fond associé au PDMS, le volume de détection demeure

limité par des contraintes optiques, notamment une profondeur de champ axiale trop étendue associée à une faible ouverture numérique, ce qui dilue la contribution des structures d'intérêt dans le signal mesuré. De plus, la densité de puissance au point focal reste relativement faible en raison de la géométrie de la sonde et de la distance de travail, réduisant l'efficacité de génération et de collecte du signal Raman dans des volumes restreints. En l'état actuel, l'utilisation d'un microspectromètre externe demeure nécessaire pour les acquisitions, ce qui souligne que l'intégration complète du système n'est pas encore atteinte.

Le Chapitre 7 constitue finalement une preuve de concept du potentiel de l'approche Raman optofluidique pour l'étude de dynamiques biologiques dans des tissus tumoraux vivants. Des variations associées à différents états cellulaires et à certaines réponses aux traitements ont pu être observées, mais les résultats demeurent préliminaires. Cette partie du projet reste limitée par le faible nombre de patients étudiés ($N=1$), par la variabilité biologique importante des tissus et par l'absence initiale de contrôle de qualité systématique des explants. Plusieurs éléments pourront être améliorés dans le futur, notamment l'intégration complète du système, le contrôle des états biologiques induits et les conditions de culture.

Les limitations du projet sont donc à la fois mécaniques, technologiques et biologiques. Sur le plan mécanique et optique, les principales limitations concernent la géométrie actuelle de la sonde Raman, la faible ouverture numérique, la profondeur de champ trop importante et le manque de signal sur de petits volumes tissulaires. Sur le plan de l'ingénierie, le système optofluidique développé reste partiellement intégré et nécessite encore des manipulations intermédiaires et l'utilisation d'un microspectromètre externe. Finalement, sur le plan biologique, l'importante hétérogénéité tumorale, la présence de tissus nécrotiques, la variabilité entre explants et le faible nombre de patients limitent actuellement la portée des conclusions.

Ce travail s'inscrit dans un domaine encore peu exploré. La spectroscopie Raman est bien établie pour l'analyse de tissus, notamment en contexte chirurgical, mais son utilisation pour le suivi longitudinal d'explants vivants était inexistante avant ce projet. L'approche proposée combine caractérisation non destructive et modèles *ex vivo*, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour l'étude fonctionnelle des tissus tumoraux.

À plus long terme, cette approche pourrait s'intégrer dans un contexte de médecine personnalisée, en complément des outils actuels de pathologie. La possibilité de tester la réponse d'un tissu tumoral à différents traitements de manière non destructive représente un potentiel intéressant, bien que plusieurs étapes de développement restent nécessaires avant une application dans un contexte clinique. L'auteur considère donc que les objectifs ambitieux énoncés au Chapitre 3 ne sont que partiellement remplis, mais que le travail présenté constitue une première étape importante vers leur réalisation.

CHAPITRE 9 CONCLUSION

Ce mémoire avait pour objectif d'évaluer la faisabilité d'une approche optofluidique combinant spectroscopie Raman et explants tumoraux vivants pour l'étude non destructive des réponses biologiques.

Les résultats démontrent qu'il est possible d'extraire une information biochimique pertinente à partir de tissus tumoraux vivants et de distinguer différents états biologiques ainsi que des réponses à des traitements. Cette preuve de faisabilité constitue une étape importante, validant le potentiel de la spectroscopie Raman comme outil d'analyse fonctionnelle en contexte *ex vivo*.

Ce travail met également en évidence des éléments critiques pour le développement de cette approche. La qualité et la composition initiale du tissu apparaissent comme des facteurs déterminants, nécessitant une étape préalable de caractérisation non destructive. Sur le plan technologique, les contraintes optiques associées aux explants microdisséqués limitent actuellement l'intégration complète du système, mais identifient clairement les axes d'optimisation nécessaires.

Au-delà des résultats obtenus, ce projet établit un cadre méthodologique structuré, allant de la sélection des échantillons à l'analyse fonctionnelle longitudinale. Il démontre que l'intégration de la spectroscopie Raman dans des modèles d'explants tumoraux vivants est non seulement réalisable, mais également pertinente pour l'étude de processus biologiques complexes.

Bien que l'approche demeure à un stade préclinique, elle ouvre la voie au développement d'outils permettant d'évaluer de manière dynamique la réponse de tissus tumoraux à des traitements. À terme, ce type de méthode pourrait contribuer à l'émergence de stratégies d'analyse fonctionnelle en oncologie, complémentaires aux approches histologiques et moléculaires actuelles.

En résumé, ce travail démontre qu'une approche optofluidique basée sur la spectroscopie Raman constitue une avenue prometteuse pour l'étude des explants tumoraux vivants, tout en identifiant les étapes nécessaires pour en faire un outil robuste et intégrable dans un contexte appliqué.

Tommy Brasseur

RÉFÉRENCES

1. Berman, J. J. Tumor classification: molecular analysis meets Aristotle. *BMC Cancer* **4**, 10 (2004).
2. Diaz-Cano, S. J. Pathological Bases for a Robust Application of Cancer Molecular Classification. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 8655–8675 (2015).
3. Horbinski, C., Berger, T., Packer, R. J. & Wen, P. Y. Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours. *Nat. Rev. Neurol.* **18**, 515–529 (2022).
4. Pfister, S. M. *et al.* A Summary of the Inaugural WHO Classification of Pediatric Tumors: Transitioning from the Optical into the Molecular Era. *Cancer Discov.* **12**, 331–355 (2022).
5. Hoadley, K. A. *et al.* Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell* **173**, 291-304.e6 (2018).
6. Yan, L. & Zhang, W. Precision medicine becomes reality-tumor type-agnostic therapy. *Cancer Commun.* **38**, 6 (2018).
7. Song, Q., Merajver, S. D. & Li, J. Z. Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. *Hum. Genomics* **9**, 27 (2015).
8. Weis, L. N., Tolaney, S. M., Barrios, C. H. & Barroso-Sousa, R. Tissue-agnostic drug approvals: how does this apply to patients with breast cancer? *Npj Breast Cancer* **7**, 120 (2021).
9. Carney, M. E., Lancaster, J. M., Ford, C., Tsodikov, A. & Wiggins, C. L. A Population-Based Study of Patterns of Care for Ovarian Cancer: Who Is Seen by a Gynecologic Oncologist and Who Is Not? *Gynecol. Oncol.* **84**, 36–42 (2002).

10. Cronin, D. P. *et al.* Patterns of Care for Adjuvant Therapy in a Random Population-Based Sample of Patients Diagnosed with Colorectal Cancer. *Off. J. Am. Coll. Gastroenterol. ACG* **101**, 2308 (2006).
11. Drolet, M. *et al.* Work absence after breast cancer diagnosis: a population-based study. *CMAJ* **173**, 765–771 (2005).
12. Insinga, R. P., Glass, A. G. & Rush, B. B. Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: A population-based study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **191**, 105–113 (2004).
13. Oliveira, C. de *et al.* Understanding the costs of cancer care before and after diagnosis for the 21 most common cancers in Ontario: a population-based descriptive study. *CMAJ Open* **1**, E1–E8 (2013).
14. Berman, J. Modern classification of neoplasms: reconciling differences between morphologic and molecular approaches. *BMC Cancer* **5**, 100 (2005).
15. Khozin, S. From organs to algorithms: Redefining cancer classification in the age of artificial intelligence. *Clin. Transl. Sci.* **17**, e70001 (2024).
16. Dahabreh, I. J., Hayward, R. & Kent, D. M. Using group data to treat individuals: understanding heterogeneous treatment effects in the age of precision medicine and patient-centred evidence. *Int. J. Epidemiol.* **45**, 2184–2193 (2016).
17. Tang, M., Pearson, S.-A., Simes, R. J. & Chua, B. H. Harnessing Real-World Evidence to Advance Cancer Research. *Curr. Oncol.* **30**, 1844–1859 (2023).

18. Janiaud, P., Serghiou, S. & Ioannidis, J. P. A. New clinical trial designs in the era of precision medicine: An overview of definitions, strengths, weaknesses, and current use in oncology. *Cancer Treat. Rev.* **73**, 20–30 (2019).
19. Sung, W. W. Y., Chow, J. C. H. & Cho, W. C. S. Tumor mutational burden as a tissue-agnostic biomarker for cancer immunotherapy. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **14**, 141–143 (2021).
20. Thein, K. Z., Myat, Y. M., Park, B. S., Panigrahi, K. & Kummar, S. Target-Driven Tissue-Agnostic Drug Approvals—A New Path of Drug Development. *Cancers* **16**, (2024).
21. Gremel, G., Grannas, K., Sutton, L. A., Pontén, F. & Zieba, A. In situ Protein Detection for Companion Diagnostics. *Front. Oncol.* **3**, (2013).
22. Myers, M. B. Targeted therapies with companion diagnostics in the management of breast cancer: current perspectives. *Pharmacogenomics Pers. Med.* **9**, 7–16 (2016).
23. Chakravarty, D. & Solit, D. B. Clinical cancer genomic profiling. *Nat. Rev. Genet.* **22**, 483–501 (2021).
24. Khoury, R., Raffoul, C., Khater, C. & Hanna, C. Precision Medicine in Hematologic Malignancies: Evolving Concepts and Clinical Applications. *Biomedicines* **13**, (2025).
25. Gaffney, E., Riegman, P., Grizzle, W. & Watson, P. Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research. *Biotech. Histochem.* **93**, 373–386 (2018).
26. Pinzani, P. *et al.* Updates on liquid biopsy: current trends and future perspectives for clinical application in solid tumors. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM* **59**, 1181–1200 (2021).

27. De Las Casas, L. E. & Hicks, D. G. Pathologists at the Leading Edge of Optimizing the Tumor Tissue Journey for Diagnostic Accuracy and Molecular Testing. *Am. J. Clin. Pathol.* **155**, 781–792 (2021).
28. Penault-Llorca, F. *et al.* Expert opinion on NSCLC small specimen biomarker testing — Part 1: Tissue collection and management. *Virchows Arch.* **481**, 335–350 (2022).
29. Malapelle, U. *et al.* Liquid Biopsy for Biomarker Testing in Non-Small Cell Lung Cancer: A European Perspective. *J. Mol. Pathol.* **2**, 255–273 (2021).
30. Sivapalan, L. *et al.* Liquid biopsy approaches to capture tumor evolution and clinical outcomes during cancer immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **11**, (2023).
31. Nikanjam, M., Kato, S. & Kurzrock, R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J. Hematol. Oncol.* **15**, 131 (2022).
32. Bedard, P. L., Hansen, A. R., Ratain, M. J. & Siu, L. L. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* **501**, 355–364 (2013).
33. Gilson, P., Merlin, J.-L. & Harlé, A. Deciphering Tumour Heterogeneity: From Tissue to Liquid Biopsy. *Cancers* **14**, (2022).
34. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance | Cell Communication and Signaling | Springer Nature Link.
<https://link.springer.com/article/10.1186/s12964-020-0530-4>.
35. Zhao, N. & Rosen, J. M. Breast cancer heterogeneity through the lens of single-cell analysis and spatial pathologies. *Semin. Cancer Biol.* **82**, 3–10 (2022).

36. Pogrebniak, K. L. & Curtis, C. Harnessing Tumor Evolution to Circumvent Resistance. *Trends Genet.* **34**, 639–651 (2018).
37. Li, S. C. *et al.* Cancer genomic research at the crossroads: realizing the changing genetic landscape as intratumoral spatial and temporal heterogeneity becomes a confounding factor. *Cancer Cell Int.* **14**, 115 (2014).
38. Carstens, J. L. *et al.* Spatial multiplexing and omics. *Nat. Rev. Methods Primer* **4**, 54 (2024).
39. Lee, J. & Choi, M. Y. & J. Recent advances in spatially resolved transcriptomics: challenges and opportunities. *BMB Rep.* **55**, 113–124 (2022).
40. Friedman, A. A., Letai, A., Fisher, D. E. & Flaherty, K. T. Precision medicine for cancer with next-generation functional diagnostics. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 747–756 (2015).
41. Letai, A. Functional precision cancer medicine—moving beyond pure genomics. *Nat. Med.* **23**, 1028–1035 (2017).
42. Tsukamoto, Y. *et al.* Patient-Derived Ex Vivo Cultures and Endpoint Assays with Surrogate Biomarkers in Functional Testing for Prediction of Therapeutic Response. *Cancers* **15**, (2023).
43. Horowitz, L. F., Rodriguez, A. D., Ray, T. & Folch, A. Microfluidics for interrogating live intact tissues. *Microsyst. Nanoeng.* **6**, 69 (2020).
44. Horowitz, L. F. *et al.* Multiplexed drug testing of tumor slices using a microfluidic platform. *Npj Precis. Oncol.* **4**, 12 (2020).
45. Chakrabarty, S. *et al.* A Microfluidic Cancer-on-Chip Platform Predicts Drug Response Using Organotypic Tumor Slice Culture. *Cancer Res.* **82**, 510–520 (2022).

46. Moore, N. *et al.* A multiplexed microfluidic system for evaluation of dynamics of immune–tumor interactions. *Lab. Chip* **18**, 1844–1858 (2018).
47. Astolfi, M. *et al.* Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy. *Lab. Chip* **16**, 312–325 (2016).
48. Das, T. *et al.* Empirical chemosensitivity testing in a spheroid model of ovarian cancer using a microfluidics-based multiplex platform. *Biomicrofluidics* **7**, (2013).
49. Patra, B. *et al.* On-chip combined radiotherapy and chemotherapy testing on soft-tissue sarcoma spheroids to study cell death using flow cytometry and clonogenic assay. *Sci. Rep.* **9**, 2214 (2019).
50. Chermat, R. *et al.* Radiotherapy on-chip: microfluidics for translational radiation oncology. *Lab. Chip* **22**, 2065–2079 (2022).
51. Breslin, S. & O’Driscoll, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov. Today* **18**, 240–249 (2013).
52. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. & Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **12**, 207–218 (2014).
53. Kapałczyńska, M. *et al.* 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch. Med. Sci. AMS* **14**, 910–919 (2018).
54. Riordan, M., Hoddeson, L. & Herring, C. The Invention of the Transistor. in *More Things in Heaven and Earth: A Celebration of Physics at the Millennium* (ed. Bederson, B.) 563–578 (Springer, New York, NY, 1999). doi:10.1007/978-1-4612-1512-7_37.

55. Raj M, K. & Chakraborty, S. PDMS microfluidics: A mini review. *J. Appl. Polym. Sci.* **137**, 48958 (2020).
56. Vilkner, T., Janasek, D. & Manz, A. Micro Total Analysis Systems. Recent Developments. *Anal. Chem.* **76**, 3373–3386 (2004).
57. Tsai, H.-F., Trubelja, A., Shen, A. Q. & Bao, G. Tumour-on-a-chip: microfluidic models of tumour morphology, growth and microenvironment. *J. R. Soc. Interface* **14**, 20170137 (2017).
58. Shirure, V. S. *et al.* Tumor-on-a-chip platform to investigate progression and drug sensitivity in cell lines and patient-derived organoids. *Lab. Chip* **18**, 3687–3702 (2018).
59. Refet-Mollof, E. *et al.* Hypoxic-Core (HyCo) Spheroids Recapitulate Hallmarks of Clinical Hypoxia: A Simple Chip-Based Method for Translational Oncology. 2025.04.03.647075 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2025.04.03.647075> (2025).
60. Liu, S., Zhang, R., Liu, Y., Lin, X. & Chen, J. Cancer patient-derived organoids: Novel models for the study of natural products. *Int. J. Biol. Sci.* **21**, 4485–4503 (2025).
61. Monteiro, M. V., Zhang, Y. S., Gaspar, V. M. & Mano, J. F. 3D-bioprinted cancer-on-a-chip: level-up organotypic in vitro models. *Trends Biotechnol.* **40**, 432–447 (2022).
62. Simeone, K. *et al.* Paraffin-embedding lithography and micro-dissected tissue micro-arrays: tools for biological and pharmacological analysis of ex vivo solid tumors. *Lab. Chip* **19**, 693–705 (2019).
63. Eduati, F. *et al.* A microfluidics platform for combinatorial drug screening on cancer biopsies. *Nat. Commun.* **9**, 2434 (2018).

64. Chermat, R. *et al.* Brachytherapy-on-Chip: A Microfluidic Setup for In Vitro Interrogation of Hypoxic Spheroids. *Int. J. Radiat. Oncol.* **117**, e222–e223 (2023).
65. Schuster, B. *et al.* Automated microfluidic platform for dynamic and combinatorial drug screening of tumor organoids. *Nat. Commun.* **11**, 5271 (2020).
66. Bouquerel, C. *et al.* Bridging the gap between tumor-on-chip and clinics: a systematic review of 15 years of studies. *Lab. Chip* **23**, 3906–3935 (2023).
67. Nair, D. G. & Weiskirchen, R. Advanced In Vitro Models for Preclinical Drug Safety: Recent Progress and Prospects. *Curr. Issues Mol. Biol.* **47**, (2024).
68. Imparato, G., Urciuolo, F. & Netti, P. A. Organ on Chip Technology to Model Cancer Growth and Metastasis. *Bioengineering* **9**, (2022).
69. Gaebler, D., Hachey, S. J. & Hughes, C. C. W. Improving tumor microenvironment assessment in chip systems through next-generation technology integration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **12**, (2024).
70. Rogers, W. *et al.* Radiomics: from qualitative to quantitative imaging. *Br. J. Radiol.* **93**, 20190948 (2020).
71. Gillies, R. J., Kinahan, P. E. & Hricak, H. Radiomics: Images Are More than Pictures, They Are Data. *Radiology* **278**, 563–577 (2016).
72. Krafft, C. *et al.* Label-Free Molecular Imaging of Biological Cells and Tissues by Linear and Nonlinear Raman Spectroscopic Approaches. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 4392–4430 (2017).
73. El-Mashtoly, S. F. & Gerwert, K. Diagnostics and Therapy Assessment Using Label-Free Raman Imaging. *Anal. Chem.* **94**, 120–142 (2022).

74. Becker, L. *et al.* Raman Imaging and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy for Diagnosis of Cancer State and Metabolic Monitoring. *Cancers* **13**, (2021).
75. Auner, G. W. *et al.* Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. *Cancer Metastasis Rev.* **37**, 691–717 (2018).
76. Raman Microscopy and Associated Techniques for Label-Free Imaging of Cancer Tissue: Applied Spectroscopy Reviews: Vol 50 , No 8 - Get Access. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/05704928.2015.1052817>.
77. Boudoux, C. *Fundamentals of Biomedical Optics: From Light Interactions with Cells to Complex Imaging Systems*. (Pollux, 2017).
78. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. *ScienceDirect* <http://www.sciencedirect.com:5070/referencework/9780128032244/encyclopedia-of-spectroscopy-and-spectrometry>.
79. Yang, S. High-Wavenumber Raman Analysis. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100474> (2022) doi:10.5772/intechopen.100474.
80. Koljenović, S. *et al.* Tissue characterization using high wave number Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* **10**, 031116 (2005).
81. Jacques, S. L. Quick analysis of optical spectra to quantify epidermal melanin and papillary dermal blood content of skin. *J. Biophotonics* **8**, 309–316 (2015).
82. Sheehy, G. *et al.* Open-sourced Raman spectroscopy data processing package implementing a baseline removal algorithm validated from multiple datasets acquired in human tissue and biofluids. *J. Biomed. Opt.* **28**, 025002 (2023).

83. Jermyn, M. *et al.* Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. *Sci. Transl. Med.* **7**, 274ra19 (2015).
84. Haka, A. S. *et al.* In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using raman spectroscopy. *Cancer Res.* **66**, 3317–3322 (2006).
85. McGregor, H. C. *et al.* Real-time endoscopic Raman spectroscopy for in vivo early lung cancer detection. *J. Biophotonics* **10**, 98–110 (2017).
86. Draga, R. O. P. *et al.* In vivo bladder cancer diagnosis by high-volume Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **82**, 5993–5999 (2010).
87. Wang, J. *et al.* Simultaneous fingerprint and high-wavenumber fiber-optic Raman spectroscopy improves in vivo diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma at endoscopy. *Sci. Rep.* **5**, 12957 (2015).
88. Schleusener, J. *et al.* In vivo study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe-based Raman spectroscopy. *Exp. Dermatol.* **24**, 767–772 (2015).
89. Rao, S. *et al.* Raman Spectroscopy and Machine Learning in the Diagnosis of Breast Cancer. *Lasers Med. Sci.* **40**, 348 (2025).
90. Blake, N., Gaifulina, R., Griffin, L. D., Bell, I. M. & Thomas, G. M. H. Machine Learning of Raman Spectroscopy Data for Classifying Cancers: A Review of the Recent Literature. *Diagnostics* **12**, (2022).
91. Noh, A. *et al.* Machine learning classification and biochemical characteristics in the real-time diagnosis of gastric adenocarcinoma using Raman spectroscopy. *Sci. Rep.* **15**, 2469 (2025).

92. Relative Intensity Correction Standards for Fluorescence and Raman Spectroscopy. *NIST*
<https://www.nist.gov/programs-projects/relative-intensity-correction-standards-fluorescence-and-raman-spectroscopy>.
93. Lellinger, D. *et al.* Interlaboratory Study to Minimize Wavelength Calibration Uncertainty Due to Peak Fitting of Reference Material Spectra in Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **79**, 1669–1679 (2025).
94. Yang, H. & Gijs, M. A. M. Micro-optics for microfluidic analytical applications. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 1391–1458 (2018).
95. Paiè, P., Martínez Vázquez, R., Osellame, R., Bragheri, F. & Bassi, A. Microfluidic Based Optical Microscopes on Chip. *Cytometry A* **93**, 987–996 (2018).
96. Buchanan, B. C. & Yoon, J.-Y. Microscopic Imaging Methods for Organ-on-a-Chip Platforms. *Micromachines* **13**, (2022).
97. Peel, S. & Jackman, M. Imaging microphysiological systems: a review. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **320**, C669–C680 (2021).
98. Kurdadze, T. *et al.* On-Chip Photonic Detection Techniques for Non-Invasive In Situ Characterizations at the Microfluidic Scale. *Sensors* **24**, (2024).
99. Yan, S. *et al.* Development overview of Raman-activated cell sorting devoted to bacterial detection at single-cell level. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105**, 1315–1331 (2021).
100. Yu, X., Park, S., Lee, S., Joo, S.-W. & Choo, J. Microfluidics for disease diagnostics based on surface-enhanced raman scattering detection. *Nano Converg.* **11**, 17 (2024).

101. Calogiuri, A. *et al.* Non-invasive real-time investigation of colorectal cells tight junctions by Raman microspectroscopy analysis combined with machine learning algorithms for organ-on-chip applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **12**, (2024).
102. Han, J., Kang, U., Moon, E.-Y., Yoo, H. & Gweon, B. Imaging Technologies for Microfluidic Biochips. *BioChip J.* **16**, 255–269 (2022).
103. Kocsis, D. *et al.* Structural and Functional Analysis of Excised Skins and Human Reconstructed Epidermis with Confocal Raman Spectroscopy and in Microfluidic Diffusion Chambers. *Pharmaceutics* **14**, (2022).
104. Costa, S. *et al.* A Novel Microfluidic System for 3D Epidermis and Full-Thickness Skin Growth for Nanoparticle Safety Assessment. *Adv. Healthc. Mater.* **15**, e02518 (2026).
105. Beljebbar, A., Dukic, S., Amharref, N. & Manfait, M. Ex vivo and in vivo diagnosis of C6 glioblastoma development by Raman spectroscopy coupled to a microprobe. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 477–487 (2010).
106. Bury, D., Morais, C. L. M., Ashton, K. M., Dawson, T. P. & Martin, F. L. Ex Vivo Raman Spectrochemical Analysis Using a Handheld Probe Demonstrates High Predictive Capability of Brain Tumour Status. *Biosensors* **9**, 49 (2019).
107. Olubajo, F., Achawal, S. & Greenman, J. Development of a Microfluidic Culture Paradigm for *Ex Vivo* Maintenance of Human Glioblastoma Tissue: A New Glioblastoma Model? *Transl. Oncol.* **13**, 1–10 (2020).

108. Hattersley, S. M. *et al.* A Microfluidic System for Testing the Responses of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tissue Biopsies to Treatment with Chemotherapy Drugs. *Ann. Biomed. Eng.* **40**, 1277–1288 (2012).
109. Lockhart, E. J. *et al.* Drug testing of monodisperse arrays of live microdissected tumors using a valved multiwell microfluidic platform. *Lab. Chip* **24**, 2683–2699 (2024).
110. Dorrigiv, D., Goyette, P.-A., St-Georges-Robillard, A., Mes-Masson, A.-M. & Gervais, T. Pixelated Microfluidics for Drug Screening on Tumour Spheroids and Ex Vivo Microdissected Tumour Explants. *Cancers* **15**, 1060 (2023).
111. Blaquez-Yeste, V. *et al.* Development and preclinical evaluation of an endonasal Raman spectroscopy probe for transsphenoidal pituitary adenoma surgery. *J. Biomed. Opt.* **30**, 035004 (2025).
112. David, S. *et al.* In situ Raman spectroscopy and machine learning unveil biomolecular alterations in invasive breast cancer. *J. Biomed. Opt.* **28**, 036009 (2023).
113. Picot, F. *et al.* Image-guided Raman spectroscopy navigation system to improve transperineal prostate cancer detection. Part 1: Raman spectroscopy fiber-optics system and in situ tissue characterization. *J. Biomed. Opt.* **27**, 095003 (2022).
114. Sheehy, G. Bringing Real-Time Raman Spectroscopy Tissue Characterisation to in Vivo Applications Including Cancer Diagnosis. (Polytechnique Montréal, 2025).
115. Kralchevsky, P. & Nagayama, K. Capillary Bridges and Capillary-Bridge Forces. in *Studies in Interface Science* vol. 10 469–502 (2001).

116. cancer, C. C. S. / S. canadienne du. Ovarian cancer statistics. *Canadian Cancer Society*
<https://cancer.ca/en/cancer-information/cancer-types/ovarian/statistics> (2024).
117. Smits, A. *et al.* The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **27**, (2013).
118. Lin, X.-M., Cui, Y., Xu, Y.-H., Ren, B. & Tian, Z.-Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy: substrate-related issues. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1729–1745 (2009).
119. Parlee, S. D., Lentz, S. I., Mori, H. & MacDougald, O. A. Quantifying Size and Number of Adipocytes in Adipose Tissue. *Methods Enzymol.* **537**, 93–122 (2014).
120. XU, D. *et al.* Acute lymphocytic leukemia mimicking spondyloarthritis in an adolescent: A case report and review of the literature. *Oncol. Lett.* **11**, 1143–1145 (2016).
121. Palmai, Z., Houenoussi, K., Cohen-Kaminsky, S. & Tchertanov, L. How does binding of agonist ligands control intrinsic molecular dynamics in human NMDA receptors? *PLoS ONE* **13**, e0201234 (2018).
122. Zhou, P., He, H., Ma, H., Wang, S. & Hu, S. A Review of Optical Imaging Technologies for Microfluidics. *Micromachines* **13**, 274 (2022).
123. Testa, G., Persichetti, G. & Bernini, R. Microfluidic optical methods: A review. **40**, 257–278 (2016).
124. Marth, C., Reimer, D. & Zeimet, A. G. Front-line therapy of advanced epithelial ovarian cancer: standard treatment. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **28**, viii36–viii39 (2017).

125. Brodeur, M. N. *et al.* Carboplatin response in preclinical models for ovarian cancer: comparison of 2D monolayers, spheroids, ex vivo tumors and in vivo models. *Sci. Rep.* **11**, 18183 (2021).
126. Verrier, S., Notingher, I., Polak, J. M. & Hench, L. L. In situ monitoring of cell death using Raman microspectroscopy. *Biopolymers* **74**, 157–162 (2004).
127. Brauchle, E., Thude, S., Brucker, S. Y. & Schenke-Layland, K. Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. *Sci. Rep.* **4**, 4698 (2014).

ANNEXE A TABLE DE COMPARAISON DES PRINCIPALES MODALITÉS D'IMAGERIE ET DE SPECTROSCOPIE EN ONCOLOGIE

Tableau B.1 : Comparaison des principales modalités d'imagerie et de spectroscopie en oncologie en fonction de leurs caractéristiques, des contrastes exploités, de leurs complexité et coûts.

Modalité	Phénomène Physique	Contraste exploité	λ (nm)	Application oncologique	Complexité	Coût/ consommables
Histologie	Absorption colorant	Structure morphologique	400-1300	Diagnostic, marges	-	\$
Immunohistochimie	Absorption/fluorescence	Biomarqueur spécifique	400-1300	Marquage cellulaire	+	\$\$
Immunofluorescence	fluorescence	Biomarqueur spécifique	400-1300	Marquage cellulaire	+	\$\$
Microscopie Brightfield	Transmission/absorption	Structure morphologique	400-700	Histologie, cytologie	--	\$
Microscopie à fluorescence	Fluorescence	Fluorophore	400-1300	Marquage cellulaire	+	\$\$

<i>Microscopie confocale</i>	Sectionnement optique	Moléculaire, structurel	400- 1300	Imagerie structurelle	+	\$\$
<i>Microscopie 2 photons</i>	Absorption linéaire	Moléculaire		Tissu épais, cellulaire	+++	\$\$\$\$
<i>OCT (élastographie/ angiographie)</i>	Diffusion/absorption/ Déformation mécanique	Structurel, mécanique	800- 1300	Marges, structures	+++	\$\$\$
<i>Photoacoustique</i>	Absorption/déformation mécanique	Structurel, mécanique	400- 1300	vascularisation	+++	\$\$\$
<i>Raman</i>	Diffusion inélastique	Biochimique intrinsèque	400- 1300	Caractérisation biochimique	+++	\$\$\$
<i>SERS</i>	Raman + plasmonique	Biochimique ultrasensible	400- 1300	Caractérisation biochimique	++++	\$\$\$\$
<i>SORS</i>	Diffusion spectrale	Biochimique intrinsèque	400- 1300	Caractérisation biochimique	++++	\$\$\$
<i>FTIR</i>	Absorption vibrationnelle	biochimique	700- 2000	Caractérisation cellulaire	+	\$\$\$

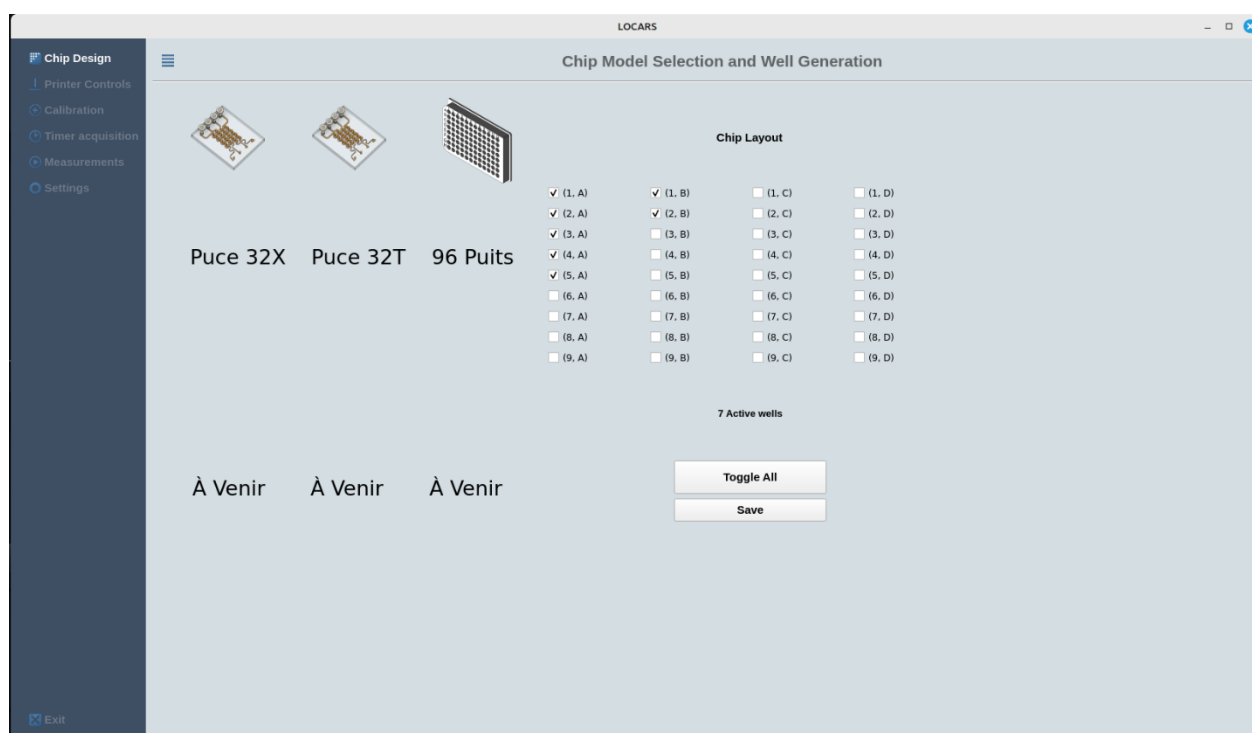
<i>UV-VIS</i>	absorption	Concentration de chromophores	200-700	Composantes biochimiques	-	\$
<i>Hyperspectrale</i>	Absorption/diffusion spectrale	spectral	400-1300	Classification tissulaire	+	\$\$
<i>Ultrason</i>	Acoustique/mécanique	Structure morphologique	MHz	Imagerie structurelle	-	\$
<i>IRM(fonctionnelle, diffusive, etc)</i>	Résonnance magnétique	Structure morphologique/fonctionnelle	MHz-GHz	Imagerie structurelle	++++	\$\$\$\$
<i>PET</i>	Décroissance radioactive	Métabolique	Gamma	Imagerie structurelle	+++	\$\$\$
<i>CT</i>	Atténuation	Densité morphologique	Rayon X	Imagerie structurelle	+++	\$\$\$
<i>FLIM</i>	Temps de décroissance fluorescent	Moléculaire	400-1300	Métabolisme	++++	\$\$\$\$
<i>FRET</i>	Transfert non-radiatif	Interactions moléculaires	400-1300	Signalisation oncogénique	++++	\$\$\$\$

ANNEXE B INTERFACE GRAPHIQUE LOCARS

Cette annexe présente les différents onglets de l'interface graphique LOCARS mentionnés au chapitre 4.

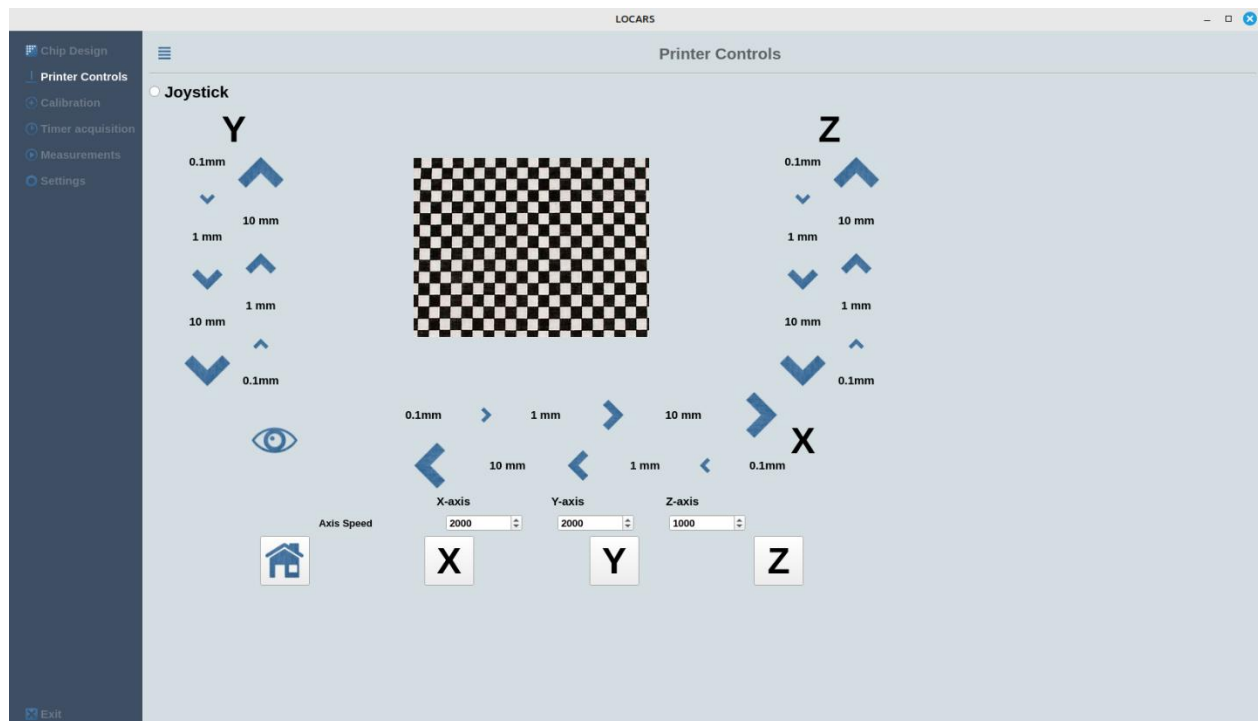
Onglet 1 : sélection de la géométrie

Cet onglet permet de sélectionner le modèle de puce microfluidique et de générer automatiquement la grille de puits correspondante.



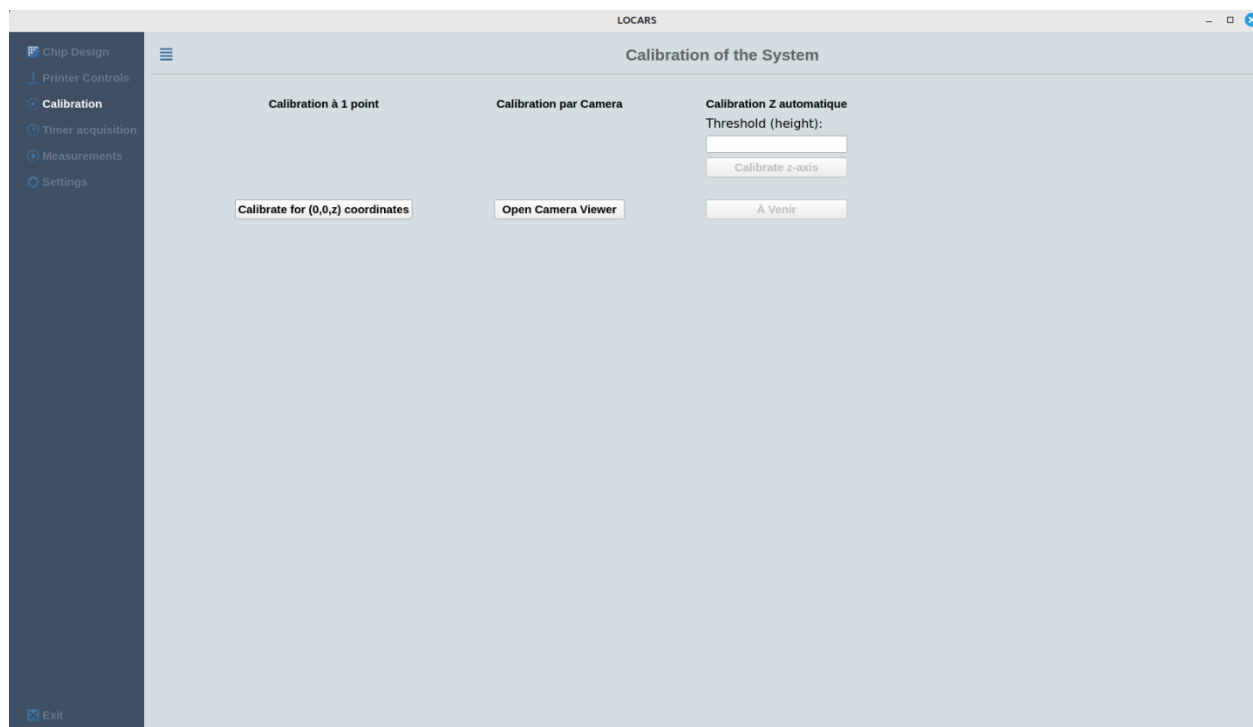
Onglet 2 : Contrôle du scanner

Cet onglet permet de déplacer la sonde manuellement le long des axes motorisés selon les commandes voulues. Une option ‘‘Joystick’’ a été codée en commentaire pour le simple plaisir de l’auteur, un achat de *Joystick* permettrait l’utilisation en mode ‘‘jeu vidéo’’ de la sonde.



Onglet 3 : Onglet de calibration

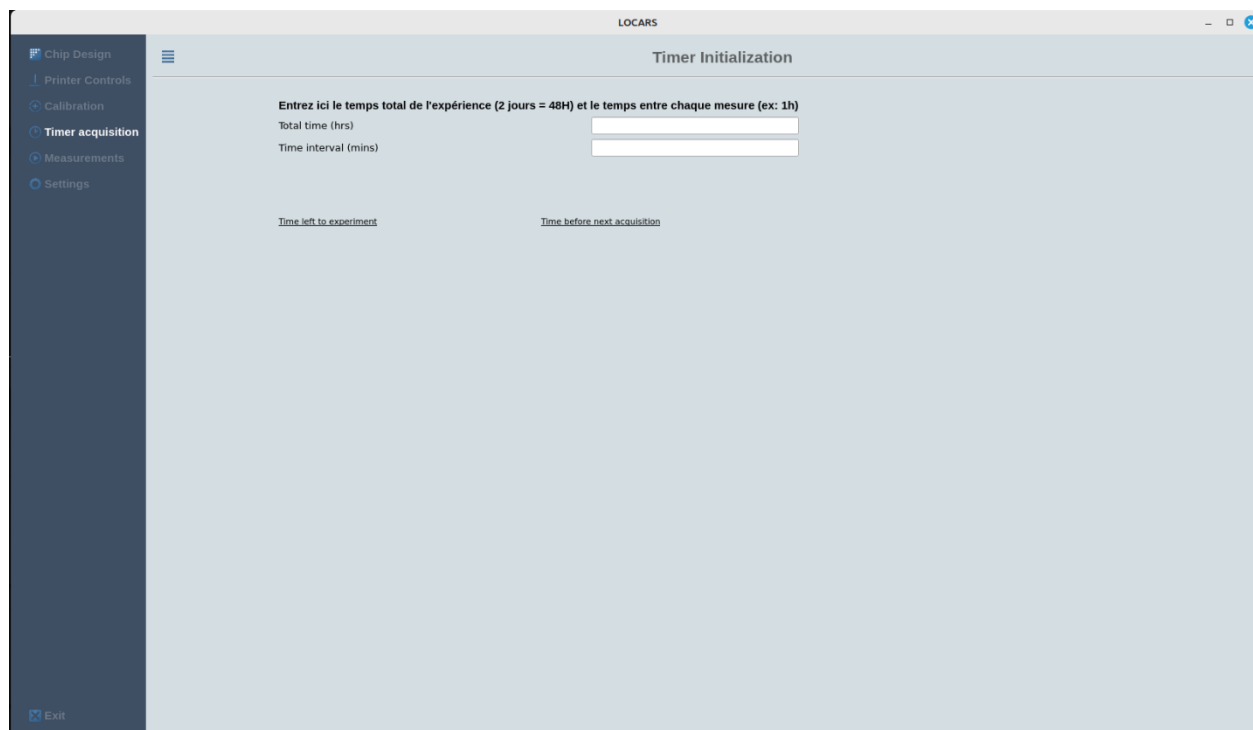
Permet de définir l'origine du système de coordonnées et de calibrer la position du premier puits. Les options de calibration logicielle (caméra) et mécanique (sonde) y sont présentes.



Onglet 4 : Onglet minuterie

Cet onglet permet de configurer des acquisitions Raman répétées sur une même puce microfluidique pendant une période prolongée. L'utilisateur spécifie la durée totale de l'expérience ainsi que l'intervalle de temps entre chaque acquisition. Le système calcule ensuite automatiquement le temps restant avant la prochaine mesure et la durée totale restante de l'expérience.

Cette fonctionnalité permet d'automatiser des expériences longitudinales sur plusieurs heures ou plusieurs jours, par exemple pour suivre l'évolution de tissus tumoraux sous traitement pharmacologique dans des conditions microfluidiques contrôlées. Cette fonctionnalité n'a pas été utilisée dans ce travail en raison du besoin de corrélation immédiate entre spectre et histopathologie. Cependant, elle deviendra pertinente dans la suite du projet.

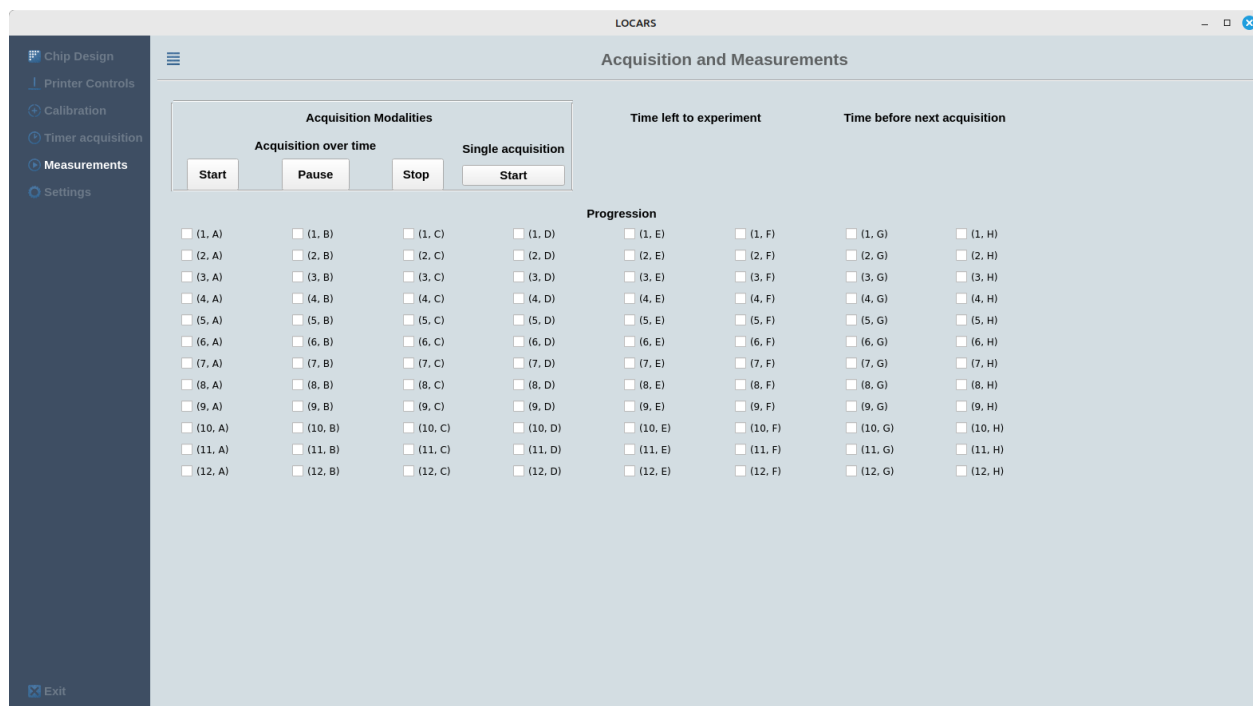


Onglet 5 : Gestion des séquences d'acquisition

Cet onglet permet de contrôler l'exécution des acquisitions Raman sur les positions sélectionnées de la puce microfluidique. Deux modes d'acquisition sont disponibles: une acquisition unique, déclenchée manuellement, ou une acquisition longitudinale utilisant les paramètres temporels définis dans l'onglet minuterie.

Dans le mode longitudinal, le logiciel exécute automatiquement une séquence d'acquisitions à intervalles réguliers pendant toute la durée de l'expérience. L'interface affiche en temps réel le temps restant de l'expérience ainsi que le délai avant la prochaine acquisition.

La grille de cases à cocher représente les positions des puits sur la puce microfluidique. L'utilisateur peut suivre quelles positions sont analysées, La progression des acquisitions est également visualisée directement dans cette grille, facilitant le suivi de la séquence automatisée.

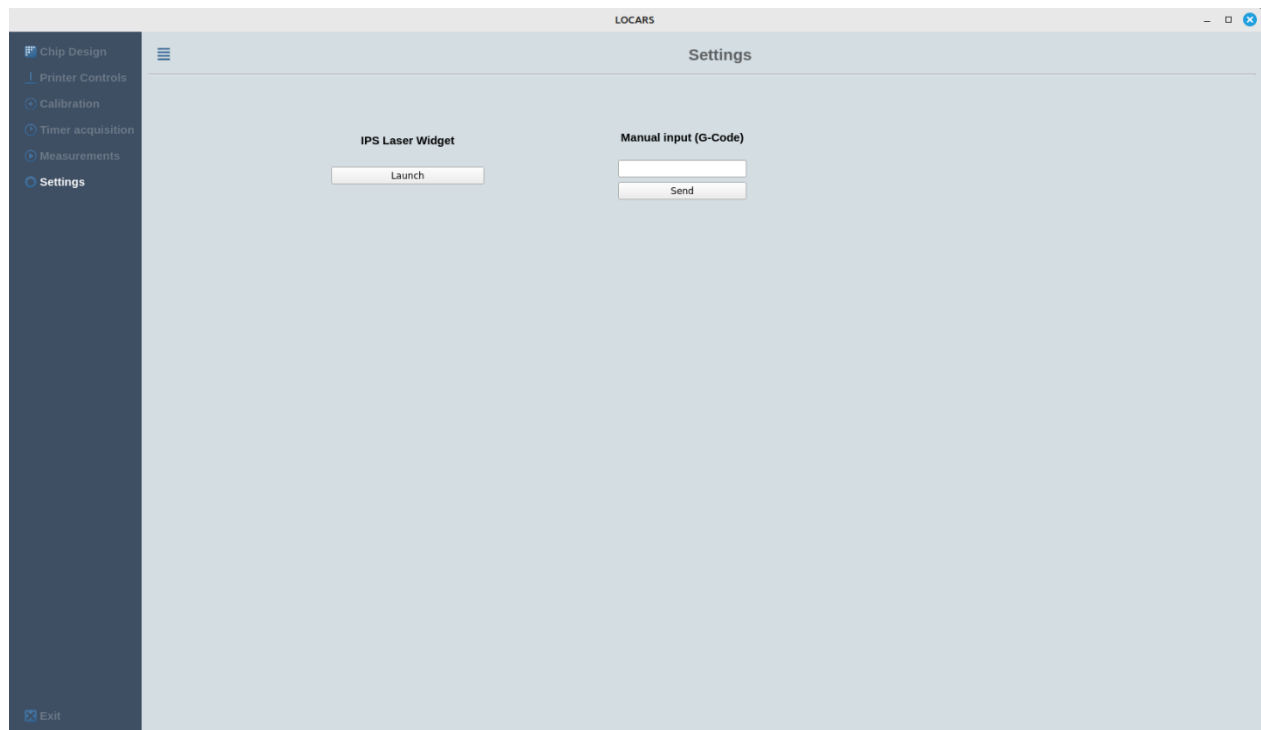


Onglet 6 : Réglages divers

Cet onglet regroupe différentes fonctionnalités auxiliaires permettant d'interagir directement avec certains composants du système. Il permet notamment de lancer le module de contrôle du laser IPS utilisé dans le système Raman, ainsi que d'envoyer manuellement des commandes G-code au contrôleur du scanner.

Le champ d'entrée G-code permet à l'utilisateur d'envoyer des commandes personnalisées directement au système de translation. Cette fonctionnalité est principalement utilisée pour le diagnostic, la vérification de mouvements spécifiques ou le dépannage du système.

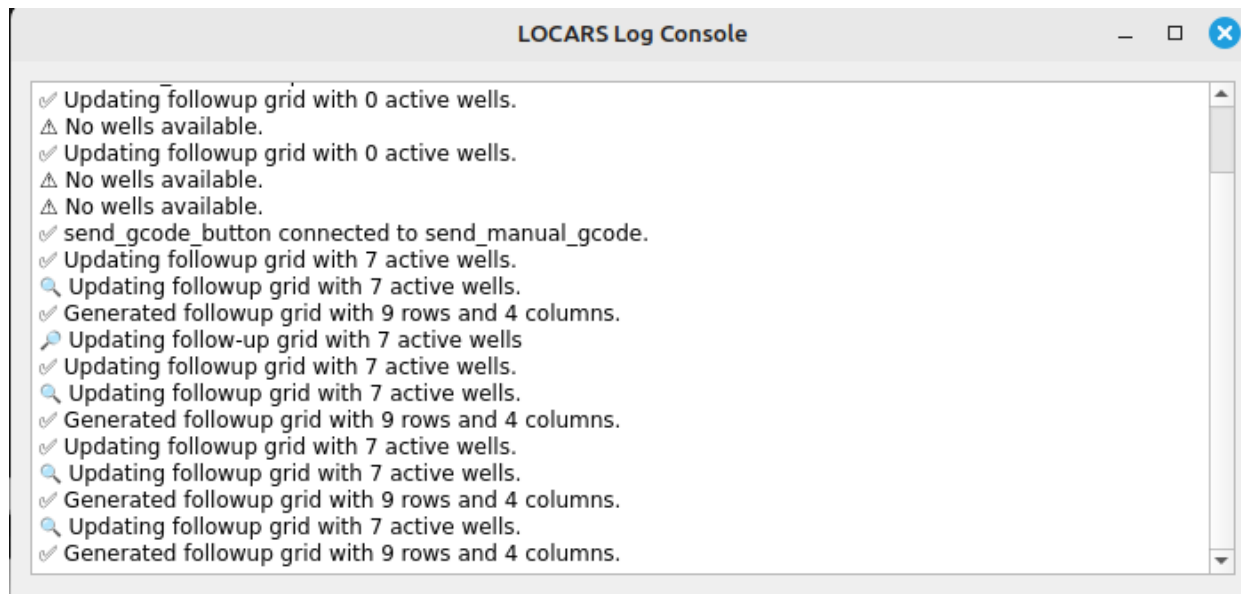
Cet onglet offre ainsi un accès direct à certaines fonctions de bas niveau du système, tout en conservant l'interface principale orientée vers l'automatisation des acquisitions. L'utilisation du Manuel input (G-code) pour contrôler le déplacement du scanner est décrite au chapitre 4.



Onglet 7 : Log file

Cet onglet affiche la console de journalisation du logiciel LOCARS. Toutes les actions importantes effectuées par le programme y sont enregistrées en temps réel, incluant la génération des grilles de puits, l'activation des puits sélectionnés, les commandes envoyées au système de translation et divers messages de diagnostic.

Ce système de journalisation permet de suivre l'exécution des opérations du logiciel et facilite l'identification d'éventuelles erreurs ou incohérences lors des acquisitions automatisées. Les messages affichés peuvent également être enregistrés dans un fichier de log, permettant de conserver un historique complet des opérations réalisées pendant une expérience.



ANNEXE C : ANALYSE STATISTIQUE DU CHAPITRE 5

Cette annexe présente les analyses statistiques ayant mené au calcul du score d'enrichissement utilisé dans la dernière figure du Chapitre 5. Les spectres Raman ont d'abord été comparés en fonction du contenu épithélial estimé pour chaque tranche tumorale. Les bandes spectrales présentant la plus forte corrélation avec ce contenu ont ensuite été identifiées par analyse de corrélation. Les corrélations ont été évaluées à l'aide du coefficient de Spearman afin de détecter des relations monotones entre l'intensité Raman et le contenu épithélial, sans supposer de relation linéaire entre ces variables. Ces bandes ont finalement été regroupées selon leurs assignations biochimiques afin de générer le score d'enrichissement présenté dans les résultats.

Les spectres sont premièrement ordonnés dans une carte thermique selon un axe Y croissant selon le contenu épithélial caractérisé en pathologie. Chaque ligne horizontale représente donc un spectre vu du dessus, avec la couleur associée correspondant à l'intensité SNV selon l'axe de droite.

Spectre Raman de tranches de tissu ordonné selon le contenu épithélial (0-99%)

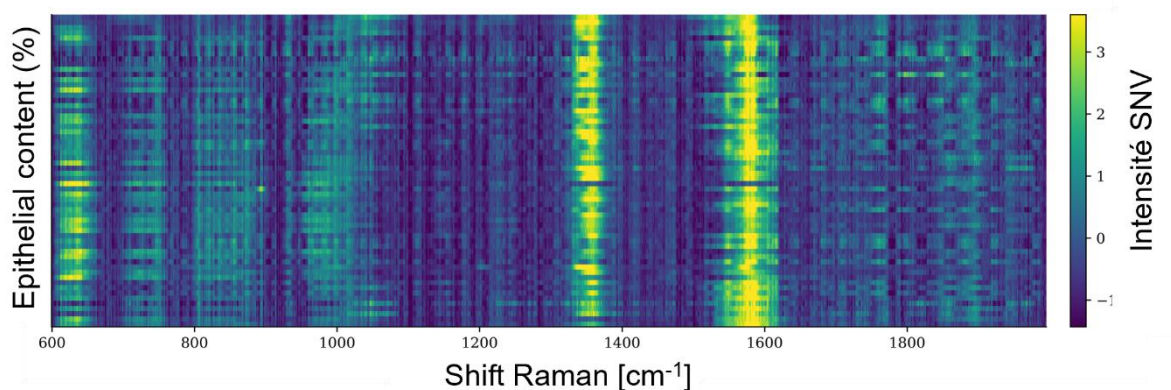


Figure C1 : Carte thermique des spectres Raman SNV pour l'ensemble des tranches analysées, triées selon le contenu épithélial estimé. Chaque ligne correspond à une tranche tumorale et chaque colonne à un nombre d'onde Raman. Cette représentation permet d'identifier visuellement les régions spectrales variant systématiquement avec la proportion d'épithélium tumoral.

Afin de quantifier des variations spectrales monotones, une analyse de corrélation de Spearman a été réalisée entre l'intensité Raman de chaque nombre d'onde et le contenu épithélial des échantillons. Les régions spectrales présentant une corrélation monotone significative ont ensuite été regroupées en bandes spectrales selon la table TC1.

Tableau C1 : Principales bandes Raman corrélées au contenu épithélial. Les plages de nombres d'onde identifiées, leur rang, le coefficient de corrélation de Spearman (ρ) ainsi que la significativité statistique associée sont indiqués

Nombre d'onde	Bande	ρ	p
1670-1691	1	0.661628	8.65e-09
1428-1443	2	0.663295	7.69e-09
1696-1709	3	0.647624	2.24e-08
854-865	4	0.631731	6.21e-08
658-668	5	0.631731	6.21e-08

Afin d'illustrer ces relations, des exemples représentatifs de corrélation entre l'intensité Raman et le contenu épithélial sont présentés à la Figure C3.

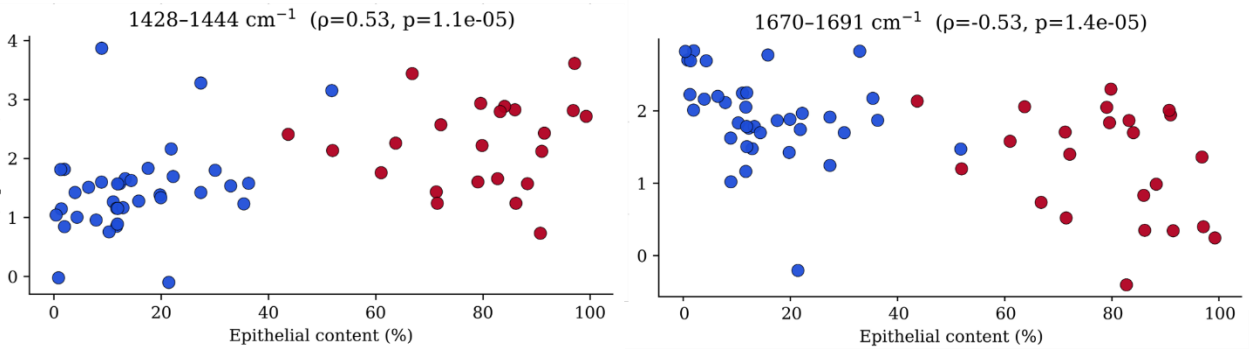


Figure C3 : Exemples de corrélations entre l'intensité Raman de bandes spectrales sélectionnées et le contenu épithélial des échantillons. Chaque point correspond à une tranche tumorale. Les coefficients de corrélation de Spearman (ρ) ainsi que les valeurs p associées sont indiqués pour chaque bande. Ces bandes ont servi de base à l'assignation biochimique et au calcul du score d'enrichissement présenté dans le Chapitre 5. Seules ces deux bandes sont utilisées puisque le résultat diminue en signifiante si plusieurs bandes sont utilisées. Les corrélations ont été évaluées à l'aide du coefficient de Spearman afin de détecter des relations monotones entre l'intensité Raman et le contenu épithélial, sans supposer de relation linéaire entre ces variables. Une analyse de corrélation de Pearson a également été réalisée à titre comparatif et a donné un coefficient d'environ 0.63 pour les principales bandes identifiées. Cette valeur, proche du coefficient de Spearman, suggère une relation approximativement linéaire entre les variables, sans toutefois permettre de la confirmer formellement.

Les bandes identifiées ont ensuite été regroupées selon leur direction de corrélation avec le contenu épithélial. Les contributions associées à l'épithélium et au stroma ont finalement été combinées en calculant la différence entre les contributions positives et négatives, permettant d'obtenir le score d'enrichissement présenté dans le Chapitre 5 à la Figure 5.6.

ANNEXE D : COMPLÉMENTS AU CHAPITRE 7

Les résultats d'optimisation sur modèles murins ne sont fait qu'en histopathologie, pas de mesures Raman n'est effectuée sur ces dernières. Pour chaque expérience, la condition idéale retenue est mentionnée.

La première optimisation est le travail d'Isaline Bontemps, et a servi à trouver le temps de repos nécessaire avant de commencer les traitements, soit 3 jours. Voici la Figure 7.

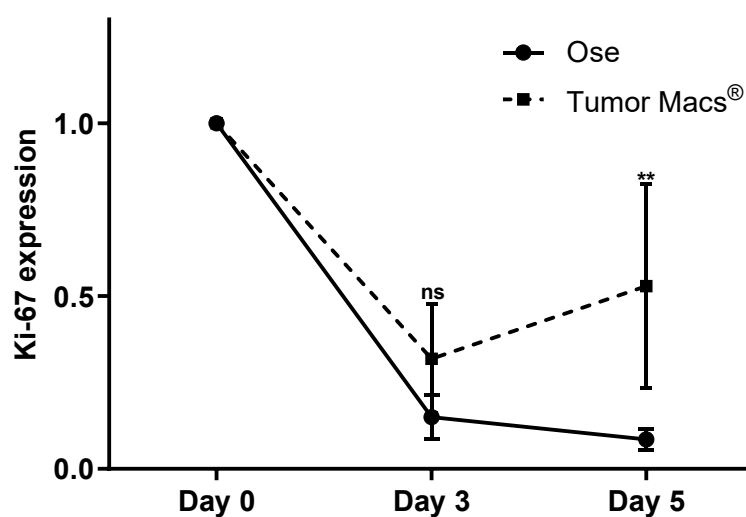


Figure 2: Viabilité des MDTs sur cinq jours de culture en comparant le milieu Tumor Macs au standard biologique, l'OSE. Le score d'IHC des MDTs pour la prolifération vient de 4 patients atteintes d'un cancer de l'utérus. ** $p < 0.001$.

Pour les états de proliférations, comme ils ne représentaient pas une conditions à optimiser, mais plutôt un niveau basal pour comparaisons, nous nous sommes simplement assurés ici qu'un tissu cultivé pendant 7 jours présentait des signes de prolifération.

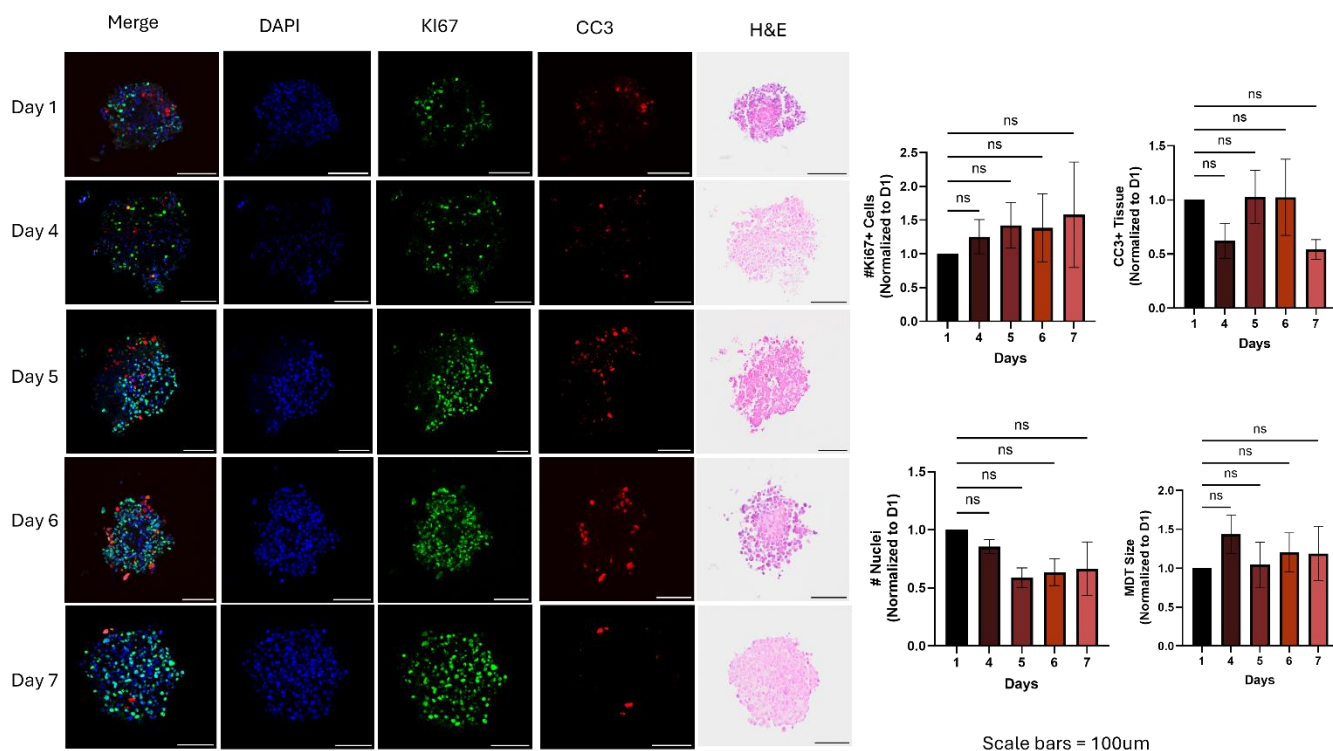


Figure 3: Résultats de 7 jours de culture pour des MDTs servant de contrôle à l'expérience d'optimisation. Les barres d'échelle sont 100 microns.

La deuxième optimisation fût pour les destins cellulaires. Pour l'apoptose, une dose de 1 micromolaire à 24h et 72h d'exposition fût testée. Aucune différence marquée n'a guidée le choix, 24h fût choisit en raison de la tombée des mesures des autres conditions.

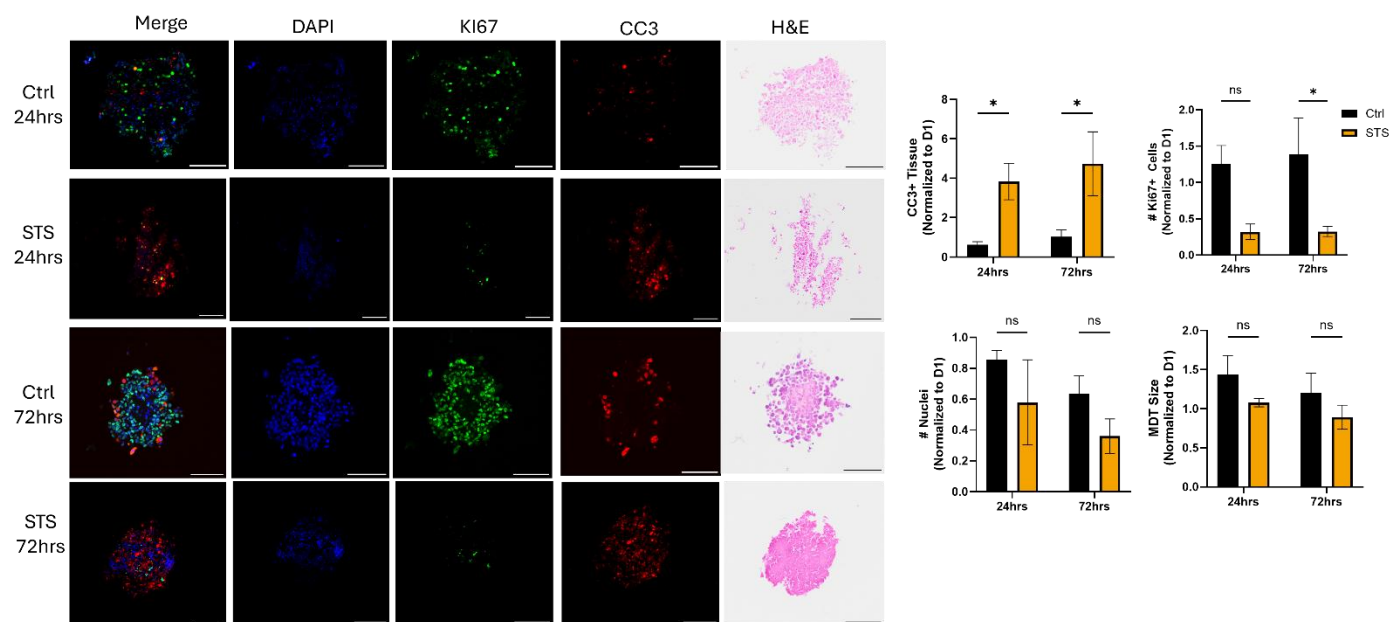


Figure 4 : Résultats d'optimisation pour l'apoptose. Les barres d'échelles sont 100 microns.

Pour la nécrose, une dose de 3 millimolaires et une dose de 10 millimolaires d'exposition fût testée, les deux pendant 24h. Seulement de petites différences apparaissent entre les deux doses, mais le marquage H&E démontre un meilleur état nécrotique pour 10mM, qui sera la condition retenue.

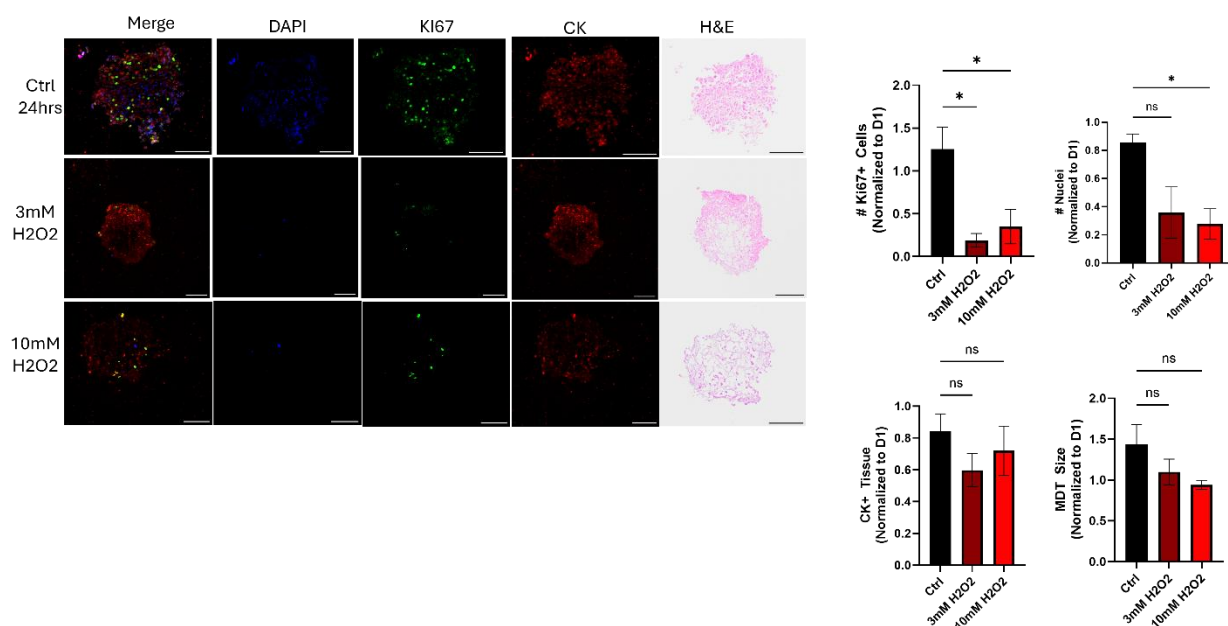


Figure 5 : Résultats d'optimisation pour la nécrose. Les barres d'échelles sont 100 microns.

La dernière optimisation avait à voir avec la radiothérapie, puisque des explants MDTs n'avaient pas encore été exposé à des doses de radiothérapies. Nous avons donc essayé deux doses de fractionnement clinique, 2Gy et 8Gy, et les avons suivi à 24, 48 et 96 heures post exposition. Les Figures 6 et 7 présentent les résultats histologiques de ces mesures. Comme peu de différences sont observables entre 48 et 96 heures, nous avons sélectionné 48h pour avoir un parallèle avec les mesures de chimiothérapie.

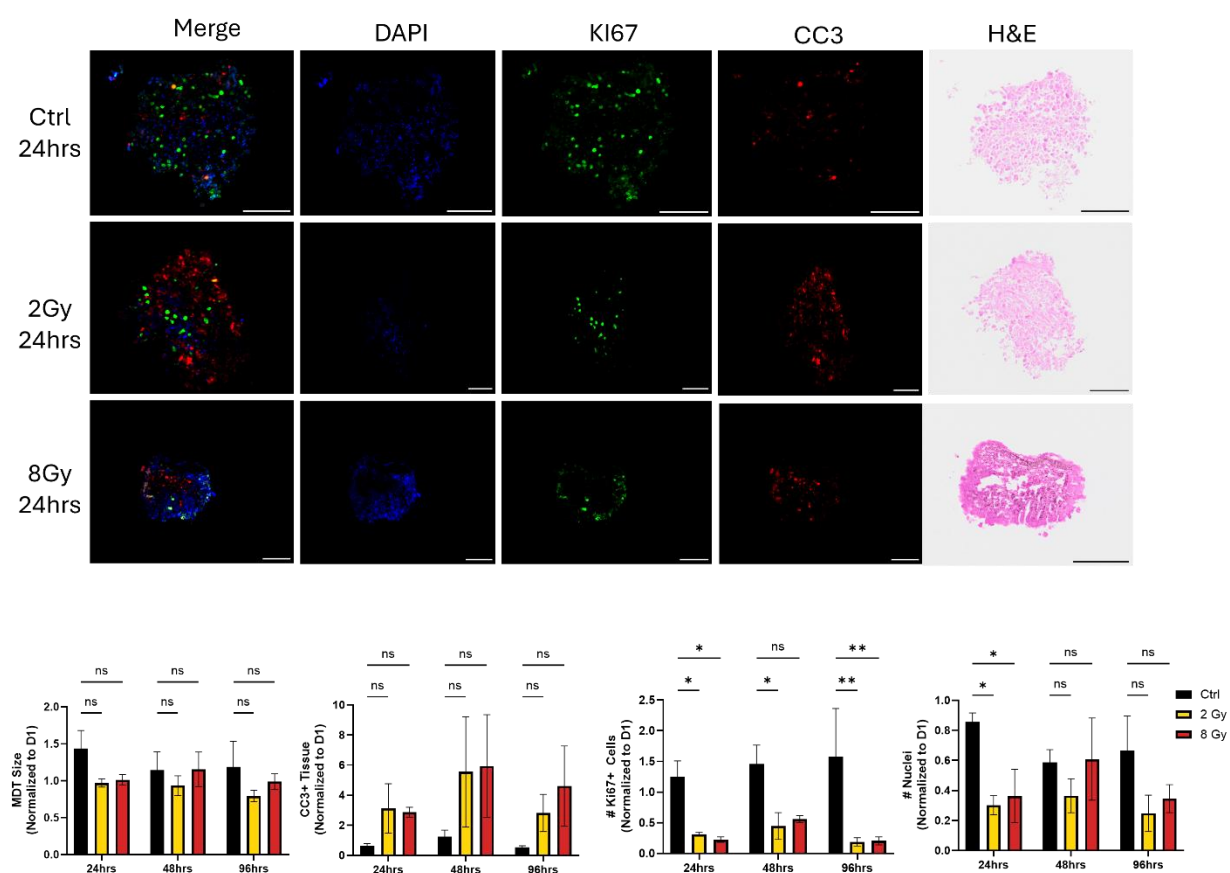


Figure 6 : Résultats de de l'exposition à la radiothérapie à 24h et histogrammes sur toutes les conditions temporelles pour l'optimisation. Les barres d'échelle sont 100 microns.

Et les images par immunofluorescences pour les deux autres points temporels.

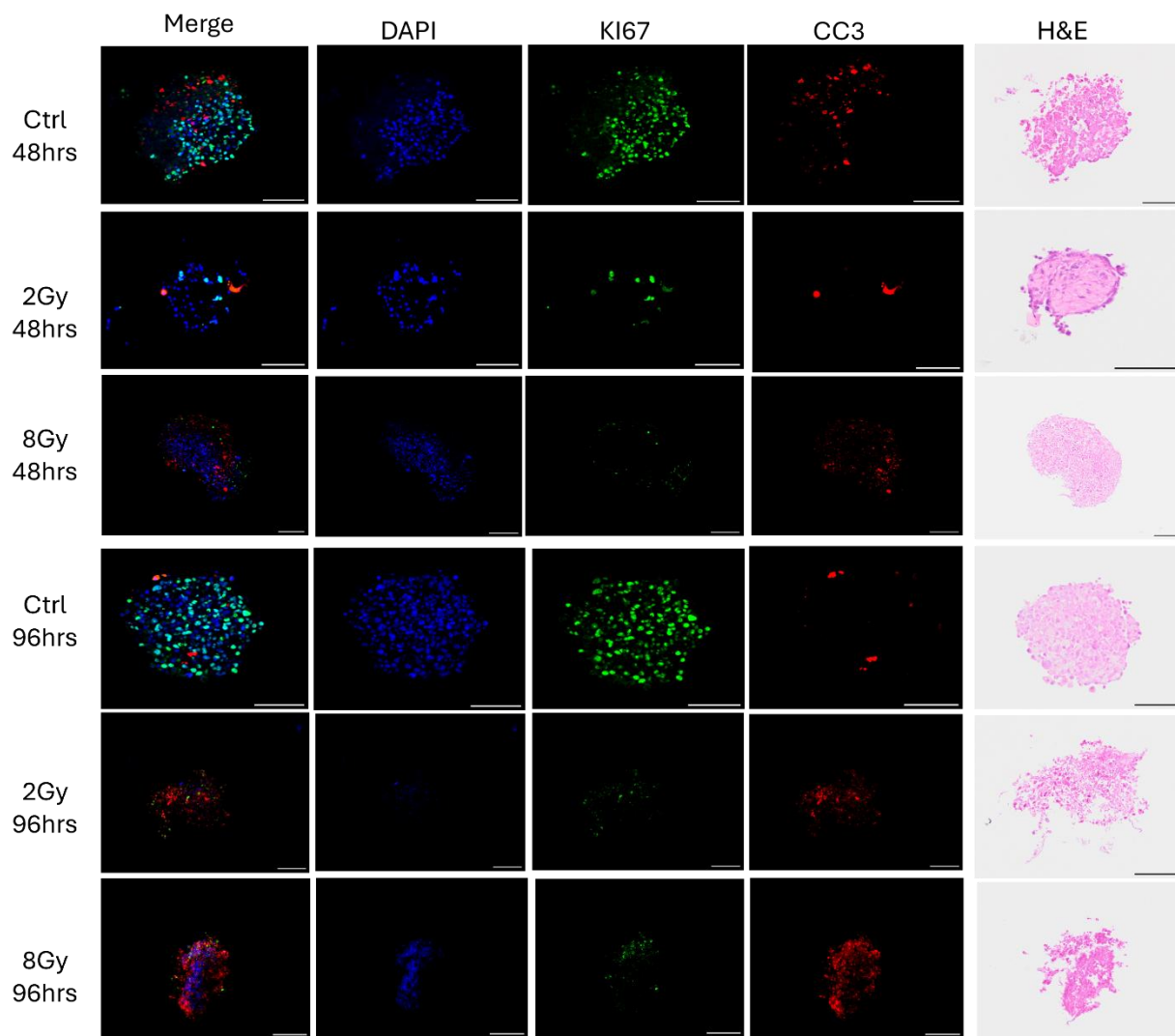


Figure 7 : Images d'immunofluorescence pour 48 et 96 heures pour les MDTs exposés à la radiothérapie. Les barres d'échelle sont 100 microns.