

Examen Final - Hiver 2011

Date : Vendredi le 6 mai 2011,

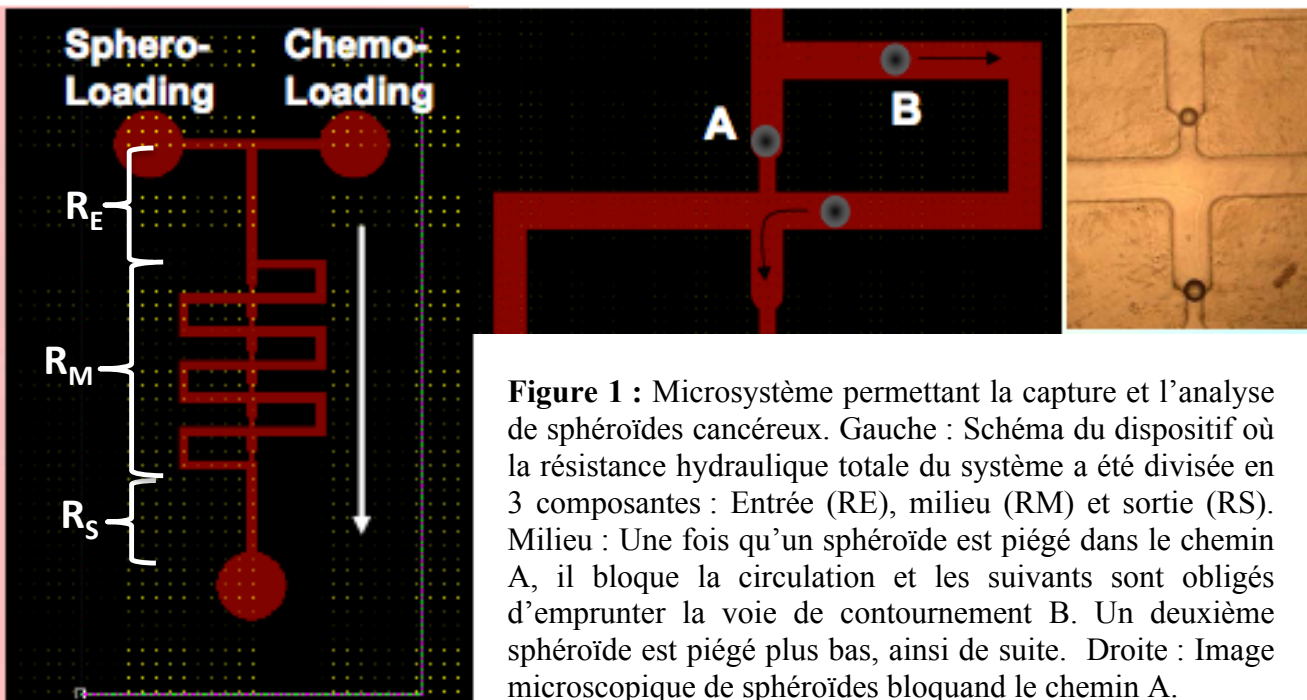
Heure : 9h30 à 12h00

Responsable du cours : Thomas Gervais

- L'examen est sur 100 points.
- Trois feuilles 8,5po X 11po manuscrites recto-verso sont permises
- Prenez soin d'expliquer votre démarche et d'exprimer vos hypothèses, car la correction en tiendra compte.
- Répondre dans le cahier fourni avec l'examen
- Remettre l'examen en même temps que le cahier
- Calculatrice non programmable (autorisée par l'École) permise

Problème 1 : Capture et analyse de sphéroïdes cancéreux (45 points)

Les sphéroïdes cancéreux sont de minuscules agrégats de cellules cancéreuses à l'origine des tumeurs. Ces agrégats constituent d'excellents modèles afin d'étudier la naissance du cancer et la formation de tissus cancéreux. Un système microfluidique qui permettrait de piéger ces sphéroïdes permettrait aussi de tester divers traitements et médicaments afin de trouver la meilleure façon de les éliminer. Nous proposons ici de faire la conception d'un tel dispositif et de modéliser le transport d'anticorps radioactifs dans les sphéroïdes avec objectif de les détruire.



Étape 1 : Fabrication et analyse du dispositif (25 points)

A) Identifiez au moins deux procédés différents afin de fabriquer le dispositif illustré sur la figure 1 à gauche. Donnez les grandes étapes de fabrication et le masque utilisé dans chacun des cas. (15 points)

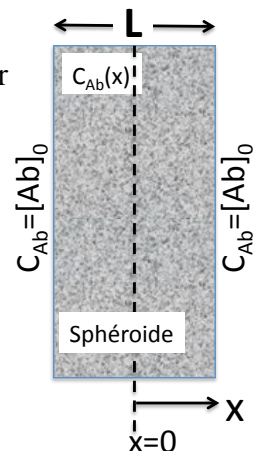
Les sphéroïdes sont acheminés dans le dispositif en fixant une différence de pression constante ΔP entre les entrées et la sortie de celui-ci. On suppose que les sphéroïdes, une fois piégés, bloquent complètement le passage rétréci (la résistance hydraulique de ce passage devient infinie). Les résistances hydrauliques du chemin A (le raccourci) et du chemin B (le détour) sont identiques et valent $R_A = R_B = 6 \text{ GPa}\cdot\text{s}/\text{m}^3$. La résistance d'entrée vaut $R_E = 10 \text{ GPa}\cdot\text{s}/\text{m}^3$ et la résistance de sortie vaut $R_S = 4 \text{ GPa}\cdot\text{s}/\text{m}^3$

B) Déterminer la différence relative de vitesse moyenne des sphéroïdes dans le canal au départ (aucun sphéroïde piégé) et à la fin de l'expérience (les sphéroïdes occupent tous les pièges). (10 points)

Étape 2 : ciblage des sphéroïdes par des anticorps radioactifs (20 points)

Une fois piégés, il serait intéressant d'utiliser un traitement de radio-oncologie afin de cibler les sphéroïdes comme on ciblerait une tumeur. Dans ces traitements, des anticorps sont conjugués chimiquement à des particules radioactives qui émettent un rayonnement de courte portée (des particules alpha ou bêta) pendant de longues durées. Les anticorps diffusent à l'intérieur du sphéroïde et se lient à des récepteurs à la surface des cellules. Le rayonnement radioactif est suffisant pour tuer les cellules cancéreuses à la surface desquelles les anticorps se sont liés. Il y a quelques années, des chercheurs (Graff et Wittrup) ont établi un modèle permettant de connaître la distribution des anticorps dans les sphéroïdes une fois l'équilibre atteint.¹

Figure 2 : Sphéroïde (tumeur) modélisé comme un plan d'épaisseur L pour simplifier les calculs. Les ordres de grandeur seront préservés. En réalité, il faudrait utiliser des équations différentielles en coordonnées sphériques pour résoudre le problème, ce qui est au-delà du niveau de ce cours.



¹ Graff et al., Theoretical Analysis of Antibody Targeting of Tumor Spheroids : Importance of Dosage for Penetration, and Affinity for Retention, Cancer Research, 63, pp. 1288-1296, 2003

Les données du problème sont les suivantes :

- Diamètre du sphéroïde : $L=300 \mu\text{m}$ (considérez-le comme plan pour simplifier les calculs, voir *Figure 2*)
- Diffusivité des anticorps dans le sphéroïde : $D = 9 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$
- Concentration volumique de récepteurs cellulaires où les anticorps peuvent se lier dans le tissu : $[R] = 1 \mu\text{M}$.
- Concentration d'anticorps à la surface du sphéroïde : $[Ab]_0 = 10 \text{ nM}$.
- Constante cinétique d'association des anticorps : $k_{\text{on}} = 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
- Constante cinétique de dissociation des anticorps : $k_{\text{off}} = 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
- Négligez la convection dans ce modèle

C) Déterminez, dans ce problème de diffusion-réaction, les temps caractéristiques de diffusion, d'association et de dissociation des anticorps ainsi que les nombres de Damköhler associés à la réaction d'association et à la réaction de dissociation dans le problème. Décrivez de façon qualitative, à partir de ces nombres, la position des anticorps en fonction du temps dans ce type de tumeurs. Indice : Les nombres de Damköhler sont volumiques ici et non surfaciques. (10 points)

D) Si on néglige la dissociation des anticorps (l'échelle de temps associée à la dissociation est beaucoup plus longue que les autres), déterminer une équation différentielle en régime permanent permettant d'exprimer la concentration $C_{Ab}(x)$ d'anticorps dans la tumeur en fonction de la position dans celle-ci. Supposez qu'il y a toujours plus de sites de liaisons libre que d'anticorps partout dans le sphéroïde ($[R] \gg [Ab]$). (5 points)

E) En résolvant l'équation trouvée en D), déterminez la concentration relative d'anticorps (C_{Ab}/C_{Ab0}) au centre de la tumeur. Ou estimez-la par des longueurs caractéristiques appropriées. (5 points)

Problème 2 : Positionnement de cellules sur puce par effets électrocinétiques (20 points)

En 2011, un groupe de recherche japonais vient de mettre sur pied un nouveau système microfluidique permettant de positionner des cellules sur une puce à l'aide d'écoulements électroosmotiques contrôlés par quatre électrodes indépendantes².

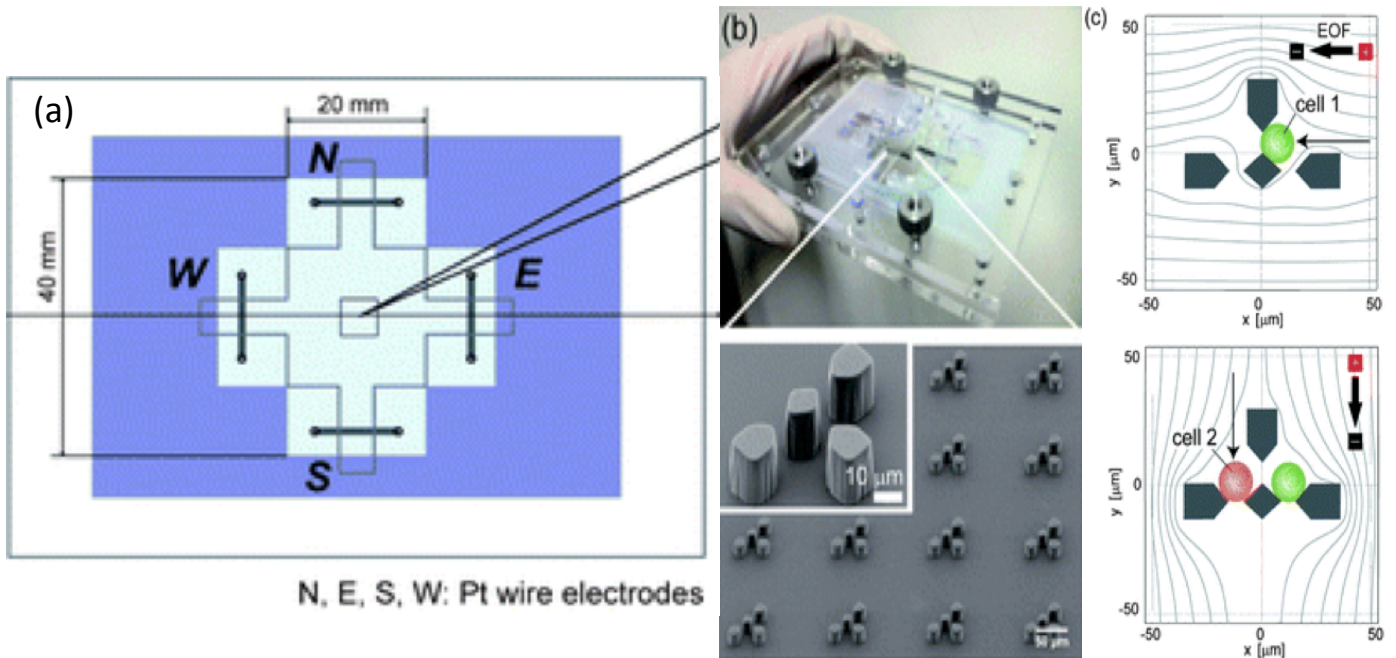


Figure 3 : (a) Structure du dispositif avec les quatre électrodes en platine (N, E, S, W) (b) Fabrication de pièges cellulaires en SU8 sur verre. (c) lignes d'écoulement dans le dispositif. Une première cellule est acheminée de gauche à droite et bloquée par le piège. Une deuxième cellule d'un type différent est acheminée de haut en bas et est aussi bloquée par le piège. La communication entre les deux cellules est ensuite étudiée.

Les données fournies par les chercheurs dans leur article sont les suivantes :

- Distance entre les électrodes E et W : 35 mm
- Distance entre les électrodes N et S : 35 mm
- Densité surfacique de charges du verre traité au plasma d'oxygène : 0,1 C/m² ou 0,6 charges/nm².
- Permittivité diélectrique de l'eau : $\epsilon = 80\epsilon_0 = 7,1 \times 10^{-10}$ F/m.
- Viscosité de l'eau à 37 °C : 0,7 mPa·s
- Mesure de la vitesse d'écoulement en fonction du potentiel appliqué (voir figure 4)

² Terao et al, Open-access and multi-directional electroosmotic flow chip for positioning heterotypic cells, *Lab Chip*, 11, pp. 1507-1512, 2011

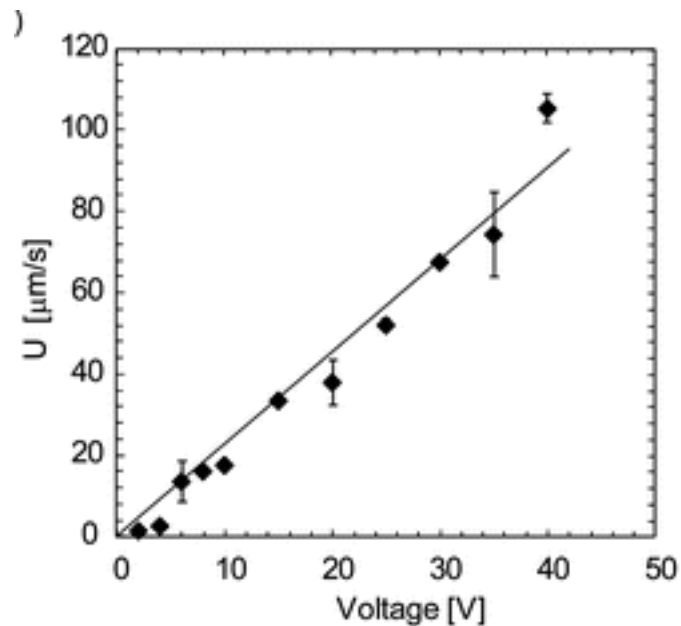


Figure 4 : Vitesse d'écoulement électroosmotique mesurée en fonction du voltage appliqué sur deux électrodes opposées.

- A) Déterminer, à l'aide des données fournies, les propriétés suivantes du problème (10 points)
- La mobilité électroosmotique du fluide μ_{EO}
 - Le potentiel zêta (ζ) des surfaces de verre
 - La longueur de Debye λ_{D} des doubles couches ioniques
 - La force ionique I de la solution tampon utilisée
- B) Quelles seraient ces mêmes quantités si les chercheurs avaient utilisé une solution tampon avec une force ionique quatre fois moindre à pH égal? (10 points)

Problème 3 : Immunologie sur ficelle et capillarité (20 points)

La *Figure 5* illustre les données de D. Juncker mesurant la distance franchie par un fluide par capillarité dans des ficelles en fonction du temps.

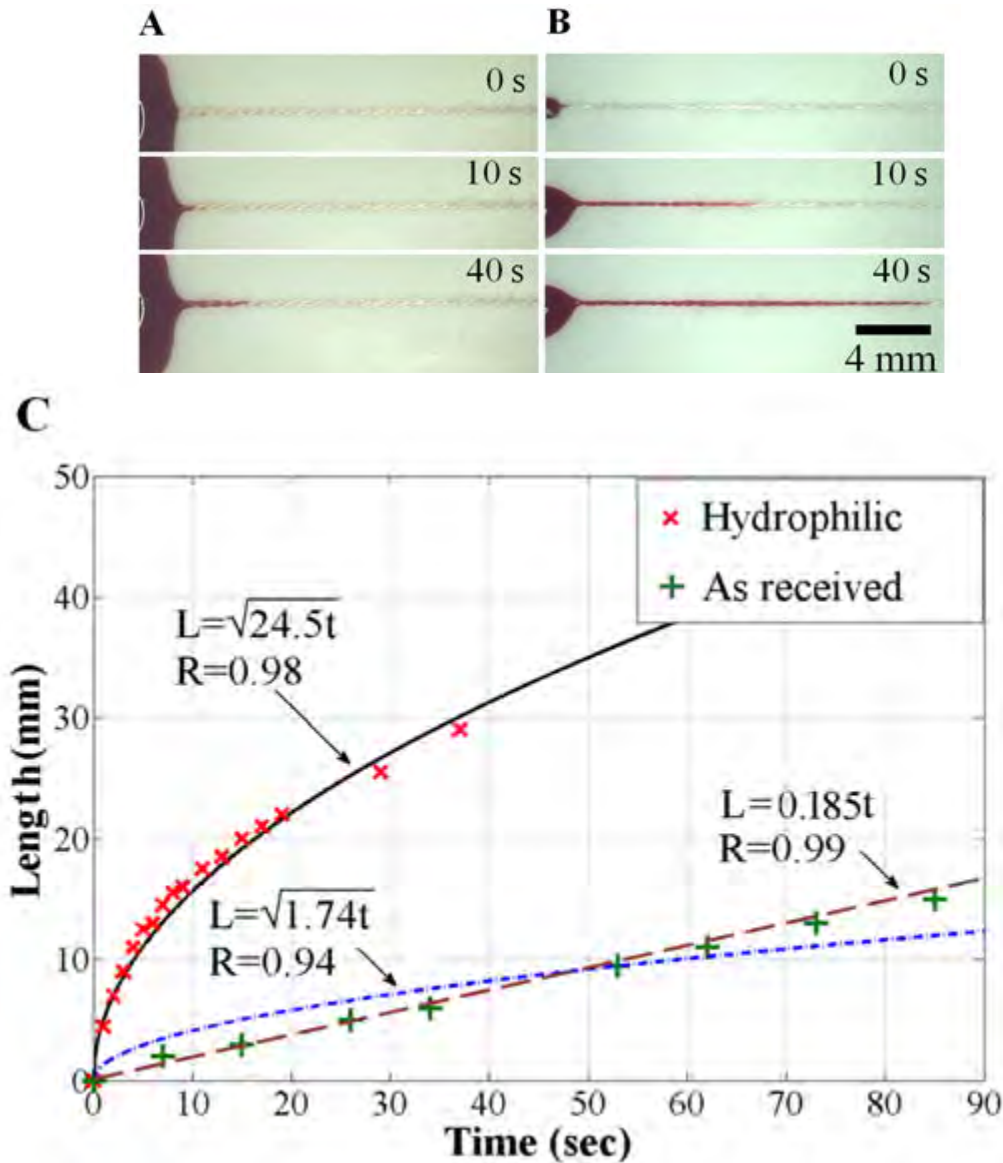


Figure 5 : Détermination expérimentale de la relation entre la distance parcourue en fonction du temps $L(t)$ dans une ficelle.

- A) Si la ficelle était un capillaire cylindrique en verre parfaitement hydrophile (courbe du haut), déterminez quel devrait être son diamètre pour que le fluide ait exactement le même comportement que dans la ficelle. Ce diamètre constitue le diamètre efficace des espaces entre les fibres de coton de la ficelle. Supposez dans les deux cas une tension de

surface $\gamma = 72 \text{ mN/m}$ pour l'eau. (Attention : La longueur L est en mm et non en m sur le graphique.) (10 points)

- B) Si on tenait cette ficelle vers le haut, quelle serait la hauteur maximale atteinte par l'eau. Selon vous, la gravité est-elle donc un facteur à considérer dans les tests immunologiques faits dans des ficelles de longueur inférieure à 10cm ? (10 points)
- C)

Problème 4 : Puce à protéines et SPR intégré (15 points)

Une équipe de recherche de Stanford³ a récemment réussi à créer une puce à protéine intégrée à un biocapteur SPR (voir Figure 6). Sur cette puce, des centaines de petits carrés d'or sont utilisés comme surface de détection SPR. Pour tester la capacité de détection de leur système, les chercheurs ont fonctionnalisé les carrés d'or d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) conjuguée à de la biotine (une biomolécule couramment utilisée et bon marché). Une fois la fonctionnalisation terminée, une solution d'anticorps spécifiques à la biotine est ensuite acheminée par une série de valves (non illustrées ici) aux carrés de détection. Chacun des carrés fournit une mesure SPR de cinétique de réaction. Les résultats sont analysés et représentés dans les courbes de la *Figure 7*.

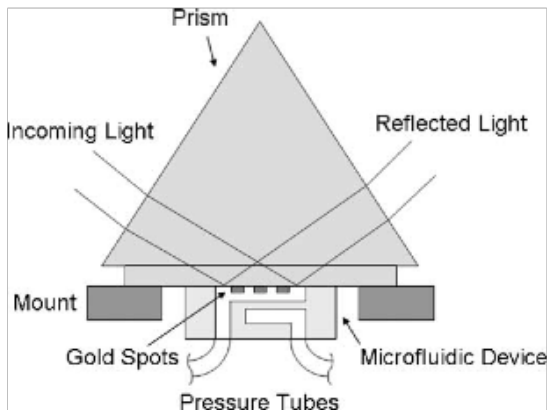


Figure 6 : Schéma d'un système de détection SPR intégré sur une puce. Chaque petit carré (gold spot) fournit une mesure de cinétique de réaction protéine-protéine à sa surface.

³ Luo et al., Microfluidic devices for immunoassays based on surface plasmon resonance imaging, *Lab Chip*, 2008, 8, 694-700

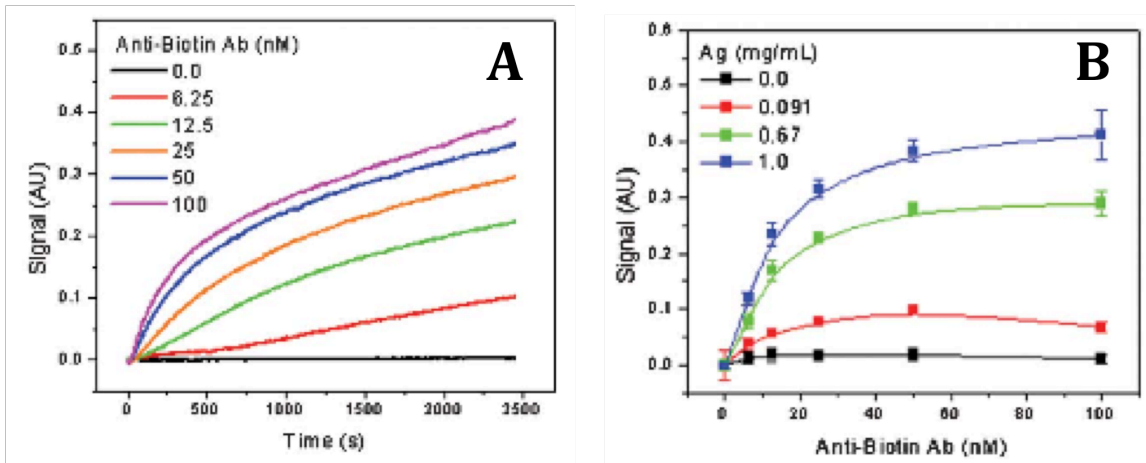


Figure 7 : Courbe SPR obtenues dans le dispositif. A) Signal (en unités arbitraires) en fonction du temps pour diverses concentration d'anticorps. B) Signal (en unités arbitraires) en fonction de la concentration d'anticorps

Questions :

- A) Donnez au moins une méthode de fonctionnalisation possible pour immobiliser les antigènes (le BSA-biotine) sur les surfaces d'or. (5 points)
- B) Un problème expérimental fait en sorte que les courbes de détection de la figure 7A ne semblent jamais atteindre la saturation. D'après vous, que se produit-il au niveau moléculaire dans cette expérience qui puisse expliquer de telles courbes? (5 points)

Le problème illustré en B est corrigé en comparant les signaux de la figure 7A avec une expérience contrôle ou on fait réagir des anticorps sur une surface d'or recouverte de BSA (sans biotine). Les courbes de la figure 7B sont obtenues pour diverses concentration de BSA-biotine à la surface d'or.

- C) Estimez la constante d'équilibre K_D de la réaction anticorps – antigène d'après les données présentées à la figure 7B. (5 points)