

Université de Montréal

Optimisation d'un système microfluidique pour le test d'agents thérapeutiques avec la
radiothérapie

Par

Maeva Bavoux

Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise en sciences appliquées

En génie biomédical

19 Novembre 2019

© Maeva Bavoux, 2019

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé

**Optimisation d'un système microfluidique pour le test d'agents thérapeutiques avec la
radiothérapie**

Présenté par

Maeva Bavoux

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Noël Raynal

Président-rapporteur

Philip Wong

Directeur de recherche

Thomas Gervais

Codirecteur

Gregory De Crescenzo

Membre du jury

Résumé

Au moins 60% des patients atteints de cancer vont recevoir de la radiothérapie (RT). L'efficacité de la radiothérapie dans le traitement du cancer est limitée par le phénomène de radiorésistance des cellules cancéreuses et par la toxicité des radiations sur les tissus sains. La découverte de nouveaux agents radiosensibilisants et radioprotecteurs permettrait de surmonter ces difficultés. Les modèles cellulaires 3D tels que les sphéroïdes, émergent motivés par le besoin de modèles précliniques plus proches des tumeurs *in vivo*. L'objectif du projet est d'optimiser un système microfluidique pour tester facilement et à faible coût des agents thérapeutiques avec la RT sur des sphéroïdes dans un contexte de repositionnement. Le système microfluidique développé permet la formation de 336 sphéroïdes homogènes en deux jours avec intervention minimale de l'utilisateur. Les sphéroïdes sont répartis dans 16 chambres de culture séparées par un système de valve magnétique pour éviter des effets *bystander* entre sphéroïdes irradiés et non-irradiés. Une nouvelle technique d'irradiation a été développée permettant d'exposer un système à 4 doses de radiation différentes. En tout, 4 doses de radiation et 4 concentrations d'agents thérapeutiques peuvent être testées par système. En utilisant cette approche, l'efficacité de trois agents avec la RT a été évaluée avec des tests de survie clonogénique. Nous avons démontré que le Talazoparib, un inhibiteur de PARP, radiosensibilise les cellules de sarcome de tissus mous (STS) cultivés en sphéroïdes à 2 Gy. Le système développé permet d'évaluer le potentiel d'agents thérapeutiques avec la RT et contribue à l'adoption des sphéroïdes comme modèle préclinique.

Mots-clés : Radiothérapie, radiosensibilisants, radioprotecteur, sphéroïde, microfluidique, repositionnement, sarcome, orthovoltage.

Abstract

At least 60% of cancer patients will receive radiotherapy (RT) as part of their treatment. The efficacy of radiotherapy in the treatment of cancer is limited by the phenomenon of radioresistance of cancer cells and by the toxicity of radiation on healthy tissues. The discovery of new radiosensitizers and radioprotectors is essential to overcome these challenges. 3D cellular models such as spheroids emerge motivated by the need for better preclinical models. The objective of the project was to optimize a microfluidic system for easy, fast and low-cost testing of therapeutic agents with RT on spheroids. The developed microfluidic system allows the formation of 336 homogeneous spheroids in two days with minimal user intervention. The spheroids are distributed in 16 culture chambers separated by a magnetic valve system to avoid bystander effects between irradiated and unirradiated spheroids. A new irradiation technique has been developed to expose a system with 4 different radiation doses. In total, 4 radiation doses and 4 concentrations of therapeutic agents can be tested per system. Using this approach, the efficacy of three agents with RT was evaluated with clonogenic assays. Radiosensitizing properties of Talazoparib, a PARP inhibitor, on soft tissue sarcoma (STS) cells cultured as spheroids at 2 Gy were demonstrated. The developed system enables the evaluation of therapeutic agents with RT and contributes to the wide adoption of spheroids as a preclinical model.

Keywords: Radiotherapy, radiosensitizer, radioprotector, spheroid, microfluidic, repurposing, sarcoma, orthovoltage.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xiii
Chapitre 1 – Introduction.....	1
1.1 - L'importance de la radiothérapie dans le traitement du cancer.....	1
1.2 - Optimiser le processus de découverte de médicaments à l'aide du repositionnement et de meilleurs modèles précliniques.....	2
Chapitre 2 – Revue de littérature.....	5
2.1 - La radiothérapie.....	5
2.1.1 - Mécanismes d'action biologique de la radiothérapie.....	5
2.1.2 – Différents types d'appareils cliniques pour la radiothérapie.....	5
2.2 - Comparaison des différents modèles précliniques pour le test d'agents thérapeutiques avec la radiothérapie.....	6
2.2.1 - Le microenvironnement tumoral.....	6
2.2.2 – Modèle cellulaire bidimensionnel.....	7
2.2.3 – Modèle cellulaire tridimensionnel.....	8
2.2.4 – Modèles de tissus <i>ex vivo</i> issus de patients.....	9
2.2.5 – Études <i>in vivo</i> (PDX = xénogreffe tumorale dérivée de tissu de patient).....	10
2.2.6 – Récapitulatif des propriétés et limitations des différents modèles.....	10

2.3 – Culture de sphéroïdes	11
2.3.1 – Culture de sphéroïdes avec échafaudages.....	11
2.3.2 - Culture de sphéroïdes sans échafaudages.....	12
2.3.2.1 – Méthodes des gouttelettes suspendues et de flottement forcé	12
2.3.2.2 – Les laboratoires sur puce : miniaturisation de la formation de sphéroïdes	13
2.3.2.3 – Résumé des différentes méthodes de production de sphéroïdes en suspension	14
2.3.3 – L’influence de la taille des sphéroïdes sur la complexité du modèle	14
2.3.4 – Le modèle de sphéroïdes dans la recherche en radiobiologie.....	15
2.3.5 – Récapitulatif du processus de sélection du modèle	16
2.4 Systèmes développés pour le test de médicaments sur des sphéroïdes	17
2.4.1 Systèmes utilisant la technique des gouttelettes suspendues	18
2.4.2 Systèmes utilisant la technique des micropuits.....	19
2.4.2.1 Le SpheroChip	19
2.4.2.2 Le SpheroFilm	20
2.4.2.3 Plateforme générant un gradient de concentration d’agents thérapeutiques ..	20
2.4.2.4 Autres systèmes développés	20
2.5 – Solutions précédemment développées dans notre laboratoire pour le test d’agents thérapeutiques avec la radiothérapie.....	21
2.5.1 – Système de valve magnétique	21
2.5.2 – Système microfluidique et méthodologie d’irradiation.....	22
2.5.2.1 – Design du système	22
2.5.2.2 – Technique d’irradiation	23
2.6 – Analyse de la réponse au traitement combinatoire	25

2.6.1 – Test de survie clonogénique.....	25
2.6.2 – Comet assays.....	26
Chapitre 3 – Objectifs de recherche.....	28
Chapitre 4 – Article.....	30
4.1 - Abstract.....	32
4.2 - Introduction.....	33
4.3 - Material and Methods.....	36
4.4 - Results.....	40
4.5 - Discussion.....	47
4.6 - Conclusion.....	50
4.7 - References.....	52
4.8 - Acknowledgements.....	57
4.9 - Author contributions.....	57
4.10 - Supplementary figure.....	58
Chapitre 5 – Discussion générale.....	59
5.1 – Réponse aux objectifs.....	59
5.1.1 – Optimisation du système microfluidique.....	59
5.1.2 – Développement de la méthodologie d’irradiation.....	61
5.1.3 – Analyse des traitements combinatoires.....	62
5.2 – Mise en place d’un service de criblage : défis.....	63
5.2.1 – Comment trouver les bons agents à cribler?.....	63
5.2.1.1 – Les voies de signalisation et facteurs du micro-environnement impliqués dans la toxicité de la RT.....	63
5.2.1.2 – Librairies de données.....	66

5.2.2 – Défis techniques : automatisation et augmentation du débit expérimental	67
5.3 – Augmenter le réalisme du modèle tout en gardant sa simplicité : trouver le bon compromis.....	69
Chapitre 6 – Conclusion.....	71
Références bibliographiques.....	73

Liste des tableaux

<i>Tableau 1. – Liste non exhaustive de cibles biologiques pour augmenter l'efficacité thérapeutique de la RT</i>	<i>65</i>
---	-----------

Liste des figures

Figure 1. – <i>Repositionnement de médicaments. Processus standard de développement d'agents thérapeutiques et dans l'optique du repositionnement de médicament.</i>	3
Figure 2. – <i>Mécanismes directs et indirects par lesquels les radiations ionisantes causent des dommages à l'ADN.</i>	5
Figure 3. – <i>Caractéristiques du micro-environnement tumoral</i>	7
Figure 4. – <i>Caractéristiques principales des sphéroïdes</i>	8
Figure 5. – <i>Récapitulatif des propriétés des cellules en monocouches, sphéroïdes et dans les tumeurs in vivo.</i>	9
Figure 6. – <i>Comparaison des différents modèles pour le test d'agents thérapeutiques avec la RT-</i>	11
Figure 7. – <i>Comparaison des différentes méthodes de formation de sphéroïdes</i>	14
Figure 8. – <i>Choix du modèle cellulaire</i>	16
Figure 9. – <i>Plateforme de 384 gouttelettes suspendues</i>	18
Figure 10. – <i>Systèmes microfluidiques développés pour le criblage d'agents thérapeutiques sur sphéroïdes</i>	19
Figure 11. – <i>Système microfluidique développé par Brunet A. et al</i>	22
Figure 12. – <i>Système développé par Patra et al</i>	23
Figure 13. – <i>Profil de la dose d'un traitement par radiothérapie externe</i>	24
Figure 14. – <i>Modélisation du phénomène de penumbra lors de l'irradiation avec le linac du système de Patra B.</i>	25
Figure 15. – <i>Comparaison des différents systèmes développés dans le groupe : celui de Brunet A.R et de Patra B. avec le système final.</i>	60
Figure 16. – <i>Design du système.</i>	61
Figure 17. – <i>Volcano Plot issu de Cancerrxgene.</i>	66
Figure 18. – <i>Gènes impliqués dans la réparation de l'ADN</i>	67
Figure 19. – <i>Images en fluorescence de sphéroïdes STS117 formés dans le système microfluidique avec un fond en PDMS et marqués avec de la Calcéine</i>	68

Figure 20. – *Images en fluorescence de sphéroïdes STS117 formés dans le système microfluidique avec un fond de verre et marqués avec du DRAQ5.....69*

Liste des sigles et abréviations

2D : Deux dimensions ou bidimensionnel(le)

3D : Trois dimensions ou tridimensionnel(le)

ADN : Acide désoxyribonucléique

CDB : Cassure double brin

CI : Index de combinaison, de l'anglais : *combination index*

CNC : Computer numerical control

CRCHUM : Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal

CSB : Cassure simple brin

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole, agent intercalant d'ADN qui marque en bleu toutes les cellules viables et mortes

DMR : Facteur de modification de la dose, de l'anglais : *dose modifying ratio*

ECM : Matrice extra-cellulaire, de l'anglais : *extracellular matrix*

EDTA : De l'anglais, *Ethylenediaminetetraacetic acid*

FBS : Sérum de veau foetal, de l'anglais : *fetal bovine serum*, supplément de milieu

LINAC : Accélérateur linéaire de particule, de l'anglais : *linear accelerator*

PARP : Poly (ADP-ribose) polymérase

PDMS : Polydimethylsiloxane

PI : Iodure de propidium, de l'anglais : *propidium iodide*

R&D : Recherche et développement

RT : Radiothérapie

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, de l'anglais : *vascular endothelial growth factor*

A ma grand-mère Régine, ma tante Antonia

Et à tous ceux qui se battent chaque jour contre le cancer.

Remerciements

Un grand merci à mes directeurs Philip et Thomas pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet multidisciplinaire qui m'a tant appris. Merci de votre patience et de votre soutien tout au long de ma maîtrise. Je tiens à remercier mon équipe au CHUM pour m'avoir initié à la biologie et pour tous ces bons moments passés ensemble. Merci à Yuji pour sa grande aide et son beau travail dans le développement de la technique d'irradiation. De plus, merci d'avoir relu avec beaucoup d'attention l'article scientifique et pour tes conseils. Merci à mon équipe de Polytechnique pour votre aide sur tous les aspects techniques de ma maîtrise et pour votre bonne humeur. En particulier, merci à Amélie pour son aide précieuse au début de ma maîtrise, pour sa gentillesse et sa patience.

Un grand merci à ma famille et mes amis pour leur soutien. En particulier à mes parents, pour m'avoir encouragé et avoir toujours cru en moi. Merci à mon compagnon Ludovic pour m'avoir épaulée et supportée pendant toute ma maîtrise. Merci d'avoir écouté mes nombreuses présentations orales et d'avoir été là pour moi.

Chapitre 1 – Introduction

1.1 - L'importance de la radiothérapie dans le traitement du cancer

Au Canada, le cancer continue d'être la cause principale de mortalité. Malgré une compréhension grandissante des mécanismes biologiques qui en sont responsables et d'une avancée des traitements, il est estimé qu'un canadien sur deux sera diagnostiqué avec un cancer au cours de sa vie et qu'un quart en mourra¹. Il est de plus nécessaire de s'inquiéter du poids du cancer comme il risque d'augmenter dans le futur avec l'augmentation de la population et son vieillissement².

Au moins 60% des patients atteints de cancer recevront de la radiothérapie (RT) au cours de leur traitement³. Dans la majorité des cas, la RT est combinée avec d'autres traitements comme la chirurgie, la chimiothérapie ou l'immunothérapie⁴. Sa combinaison pré-chirurgie permet de réduire la taille de la tumeur et donc d'en faciliter l'extraction. Post-chirurgie, elle permet de réduire le risque de récurrence⁵. Dans de rares cas, la RT peut être curative. Elle est aussi utilisée à des fins palliatives pour réduire ou éliminer la douleur⁶.

La RT a donc un rôle important dans le traitement du cancer. Cependant, dû au phénomène de radiorésistance de la tumeur, engendré notamment par la présence d'hypoxie et de cellules souches cancéreuses, le traitement de tumeurs avec la RT seule reste difficile^{6,7}. Bien que de très hautes doses de radiation puissent entraîner la mort de la totalité des cellules tumorales, la toxicité de cette approche pour le patient prévient son utilisation. Plusieurs efforts ont été portés pour augmenter la précision du traitement par radiation, comme le développement de nouvelles techniques d'imagerie médicale. Ces avancées doivent maintenant être complétées par des innovations biologiques telles que la découverte de nouveaux agents radiosensibilisants et radioprotecteurs⁷. L'introduction de radiosensibilisants destinés à augmenter la radiosensibilité des cellules tumorales permet d'augmenter l'efficacité du traitement par radiation^{8,9}. Les agents radioprotecteurs, eux, permettent de réduire les effets secondaires long-terms de la RT. Malgré cette nécessité, peu d'études sont effectuées sur les effets combinatoires d'agents moléculaires avec la RT¹⁰. A l'heure actuelle, un seul agent radiosensibilisant a été approuvé par la *Food and*

Drug Administration (FDA) pour être utilisé en combinaison avec la RT. Il s'agit de Cetuximab, un inhibiteur d'EGFR (récepteur de facteurs de croissances épidermique), utilisé pour traiter le cancer de la tête et du cou¹¹. Peu d'agents sont développés pour être utilisés avec la RT, il est donc important de développer une nouvelle stratégie pour la découverte d'agents radiosensibilisants et radioprotecteurs.

1.2 - Optimiser le processus de découverte de médicaments à l'aide du repositionnement et de meilleurs modèles précliniques

Dans le domaine pharmaceutique, de nombreuses avancées scientifiques et technologiques ont permis d'accélérer la découverte de composés anticancer en recherche et développement (R&D). Par exemple, le séquençage rapide de l'ADN, les progrès en criblage à haut débit et en apprentissage machine ont permis de diminuer grandement les coûts de test de bibliothèques d'agents moléculaires¹². Pourtant, le développement d'un composé pharmaceutique continue d'être long (10-16 ans) et coûteux (jusqu'à 2 milliards de dollars USD)¹³. Une solution pour accélérer le processus de découverte consiste à trouver de nouvelles fonctions, hors de leur contexte médical d'origine, à des composés déjà développés, approuvés, ou qui ont été abandonnés à la suite de résultats insuffisants en phase clinique¹⁴ : c'est le repositionnement de médicament. L'exemple le plus populaire est celui du Viagra qui, originellement développé par Pfizer pour traiter des angines de poitrine, a été repositionné pour traiter les dysfonctions érectiles¹⁵. Il est donc envisageable que parmi les milliers de composés abandonnés présents dans les bibliothèques des compagnies pharmaceutiques se trouvent des molécules présentant des effets radiosensibilisants ou radioprotecteurs intéressants¹⁶.

Le repositionnement possède plusieurs avantages importants. Comme le composé a déjà été développé, les étapes de la modélisation de la molécule jusqu'à l'identification du meilleur candidat (grande affinité pour la cible biologique) ont déjà été effectuées. Dans la majorité des cas, les composés ont déjà subi des tests précliniques s'assurant de leur non-toxicité¹⁵. Tout cela permet de diminuer le temps et le coût du processus de découverte¹⁷ (Figure 1).

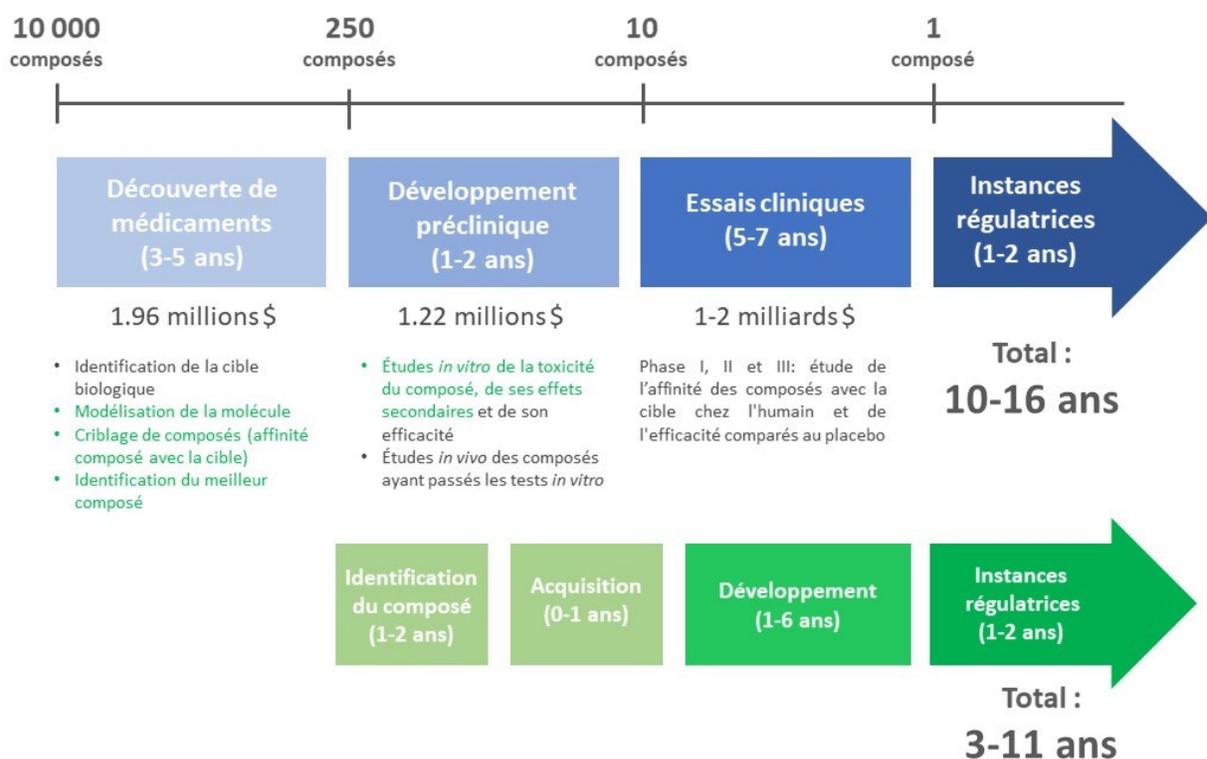


Figure 1. – Repositionnement de médicaments¹⁸. Processus standard de développement d’agents thérapeutiques (en bleu) et dans l’optique du repositionnement de médicament (en vert). Le repositionnement permet d’éliminer des étapes (en vert) permettant d’abaisser le temps et le coût total du développement.

Une autre façon d’abaisser le coût du processus de découverte d’agents thérapeutiques réside dans le développement de meilleurs modèles précliniques. En effet, 95% des agents thérapeutiques qui démontrent une activité anticancer importante dans les études précliniques échouent en phase clinique dû à un manque d’efficacité thérapeutique ou à un problème de toxicité¹⁹. L’utilisation de modèles précliniques plus représentatifs des tumeurs *in vivo* permettrait une sélection plus stringente des agents, diminuant le nombre de composés testés dans des études *in vivo* qui sont reconnues comme longues et coûteuses. Une meilleure compréhension de l’efficacité et de la toxicité de ces agents en phase préclinique permettra ultimement de diminuer le taux d’échec en phase clinique^{20,21}.

La méthode classique consiste à tester les traitements combinatoires sur des cellules cultivées en 2D. Cependant, elles sont peu représentatives des tumeurs *in vivo*²². Les sphéroïdes, agrégats cellulaires 3D, récapitulent des propriétés importantes des tumeurs *in vivo* et sont des modèles précliniques plus avancés²³. Cependant, la formation de sphéroïdes homogènes et/ou l'analyse post-traitement avec les outils actuels se révèlent laborieuses, freinant leur adoption massive comme modèles précliniques par la communauté scientifique et les entreprises pharmaceutiques^{24,25}. L'avènement de la microfluidique a permis de fournir une nouvelle façon de former simplement, et en grand nombre, des sphéroïdes et à réaliser des tests d'agents thérapeutiques à faible coût²⁶⁻²⁹.

L'enjeu de ce projet est de développer un système microfluidique permettant un criblage de combinaisons d'agents thérapeutiques avec la radiothérapie dans une optique de repositionnement de médicaments. Ce criblage sera effectué sur des sphéroïdes. Plus spécifiquement, ce mémoire décrira la conception du dispositif microfluidique et d'une technique d'irradiation permettant un grand rendement expérimental. L'approche sera validée avec le test de combinaisons d'agents thérapeutiques avec la radiothérapie à l'aide de notre dispositif.

Chapitre 2 – Revue de littérature

2.1 - La radiothérapie

2.1.1 - Mécanismes d'action biologique de la radiothérapie

La RT cause des dommages aux tissus par des mécanismes directs et indirects (Figure 2). Les radiations causent directement des dommages aux biomolécules comme les protéines, les lipides mais surtout à l'ADN par ionisation⁵. L'effet indirect est produit par ionisation de molécules d'eau produisant des dérivés réactifs de l'oxygène tels que OH^\cdot , O_2^\cdot et H_2O_2 . Ces espèces peuvent causer des dommages à l'ADN par réactions chimiques. Les effets directs et indirects entraînent tous deux des cassures dans l'ADN qui peuvent être simple brin (CSB) ou double brin (CDB)⁵ (Figure 2).

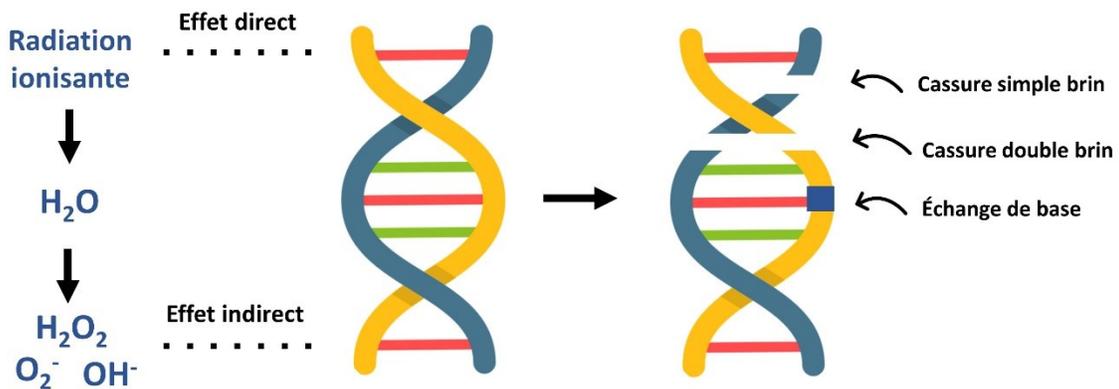


Figure 2. – Mécanismes directs et indirects par lesquels les radiations ionisantes causent des dommages à l'ADN. Adapté de [6].

2.1.2 – Différents types d'appareils cliniques pour la radiothérapie

En radiothérapie, l'énergie déposée à l'intérieur du patient est le plus souvent générée par une source à l'extérieur du patient : c'est la radiothérapie externe.

L'un des appareils les plus utilisés en radiothérapie clinique est l'accélérateur linéaire (linac). Les linacs accélèrent des faisceaux d'électrons qui, en percutant une plaque de métal lourd, produisent des rayons X (photons). Un collimateur est utilisé pour concentrer les rayons X et définir la taille du faisceau qui atteindra la surface du patient. Il absorbe les rayons X dispersés latéralement, minimisant les pertes. Les rayons X produits sont de haute énergie (4-25 MV).

Dans le cas du traitement de tumeurs superficielles, des appareils d'orthovoltage sont souvent utilisés^{30,31}. Ils dispensent des rayons X de plus faible énergie (100-500 kV) qui pénètrent de seulement quelques cm et permettent un contrôle local de la dose délivrée très précis. Des cônes sont utilisés pour définir la surface à traiter. Ils sont placés en contact direct avec la peau des patients.

2.2 - Comparaison des différents modèles précliniques pour le test d'agents thérapeutiques avec la radiothérapie

2.2.1 - Le microenvironnement tumoral

Pour choisir le modèle approprié il est important de comprendre les propriétés clés des tumeurs solides *in vivo*.

La vascularisation d'une tumeur solide est désorganisée et variable. Quand la tumeur grandit rapidement, l'angiogenèse (la création de nouveaux vaisseaux sanguins) ne parvient pas à suivre le rythme. Ainsi, certaines cellules tumorales se retrouvent loin de vaisseaux sanguins. Ces cellules ont alors un accès limité à l'oxygène et aux nutriments^{32,33} (Figure 3). L'hypoxie entraîne une résistance plus importante à des traitements comme la RT et la chimiothérapie^{32,34,35}. Le manque d'oxygène limite la production de dérivés réactifs de l'oxygène, l'un des mécanismes d'action principale du traitement par radiation. La privation de nutriments provoque quant à elle l'arrêt du cycle cellulaire et une réduction de la prolifération. La plupart des chimiothérapies visent les cellules hautement prolifératives. Les cellules proliférant peu (cellules au repos), situées loin des vaisseaux sanguins, sont alors plus résistantes à ce type de traitement^{33,36}

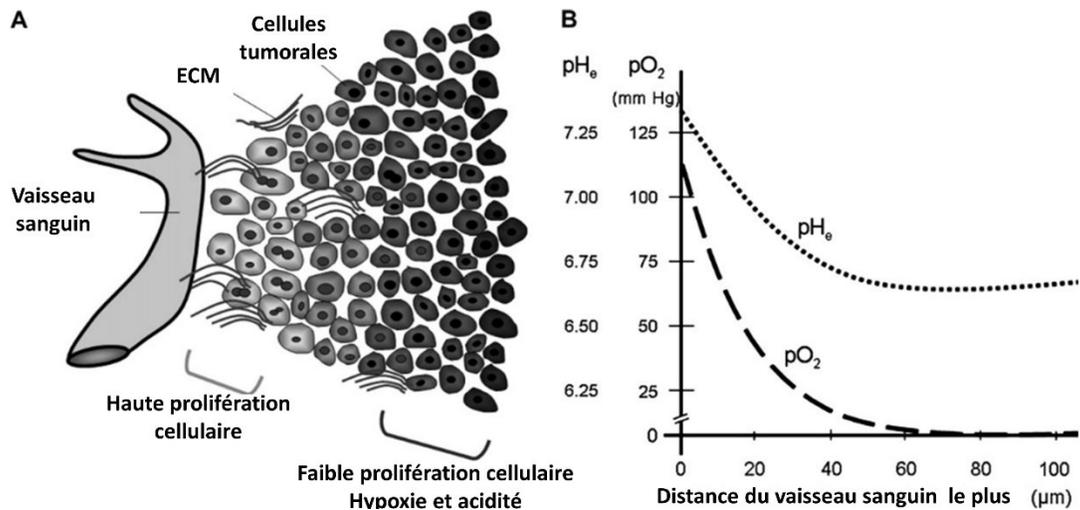


Figure 3. – *Caractéristiques du micro-environnement tumoral. Les cellules éloignées des vaisseaux sanguins ont un apport en oxygène plus faible (B) et prolifèrent peu (A). Ces caractéristiques influent sur la réponse de la tumeur au traitement par radiation et par chimiothérapie. Un modèle préclinique doit récapituler ces propriétés pour être physiologiquement pertinent. Reproduit et traduit de l’anglais avec la permission de Oxford University, Copyright Clearance Center® [33].*

Ces deux propriétés (hypoxie et prolifération cellulaire) sont caractéristiques des tumeurs *in vivo* et ont un rôle important dans la réponse au traitement combinatoire. Pour un criblage de composés efficace, le modèle utilisé devrait récapituler ces caractéristiques.

2.2.2 – Modèle cellulaire bidimensionnel

Le standard actuel pour les études *in vitro* est de tester sur des monocouches de cellules en 2D. Il est estimé que 70% des biologistes moléculaires et cellulaires se basent toujours sur les résultats d’expériences utilisant des modèles cellulaires 2D avant de poursuivre avec les études *in vivo*³⁷. Plusieurs raisons expliquent l’intérêt des chercheurs pour les cultures 2D. Tout d’abord, l’environnement cellulaire est facilement contrôlable et le changement de milieu est aisé car les cellules sont adhérentes. De plus, les analyses en microscopie sont facilitées car les cellules sont toutes sur un même plan³⁸. Enfin, cette méthode de culture est compatible avec la grande majorité des lignées cellulaires et permet un criblage haut débit de composés. Cependant, ces modèles 2D ont de la peine à récapituler les propriétés clés des tumeurs *in vivo*²².

2.2.3 – Modèle cellulaire tridimensionnel

En raison des limitations des modèles 2D, les chercheurs se tournent de plus en plus vers des modèles 3D. Le modèle de sphéroïdes, agrégats cellulaires sphériques 3D, est l'un des modèles *in vitro* les plus utilisés après les modèles 2D³⁹. Les sphéroïdes récapitulent des propriétés importantes des tumeurs *in vivo*. Tout d'abord, les sphéroïdes possèdent des motifs de différenciation similaires à ceux observés *in vivo*⁴⁰⁻⁴². Ensuite, dû à leur conformation 3D, des gradients de métabolites et d'oxygène sont générés entre la surface et le cœur du sphéroïde, générant trois couches distinctes : un cœur nécrotique au centre du sphéroïde (zone hypoxique), une couche de cellules au repos (état réversible dans lequel la cellule ne se divise pas) et une couche extérieure de cellules prolifératives^{23,43,44} (Figure 4). La production de lactate par les cellules en hypoxie entraîne la génération d'un environnement acide dans les tumeurs humaines (Figure 3). La génération d'un gradient de pH due à une accumulation de lactate peut aussi être observée dans les sphéroïdes (Figure 4).

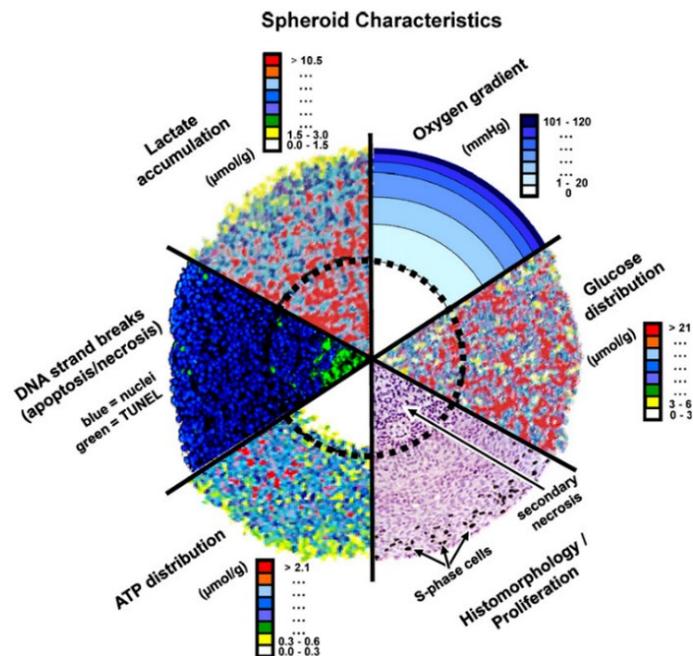


Figure 4. – Caractéristiques principales des sphéroïdes. Dû à leur conformation 3D, différents gradients de métabolites s'établissent entre la surface et le cœur résultant en des propriétés biologiques différentes (prolifération, apoptose etc.). Reproduit avec la permission de Elsevier, Copyright Clearance Center® [23].

In vitro, plusieurs études démontrent que les cellules cultivées en sphéroïdes acquièrent une résistance plus importante à l'apoptose comparé aux cellules cultivées en 2D⁴¹⁻⁴⁴. Comme l'induction de l'apoptose est impliquée dans le processus de mort cellulaire à la suite de radiations ionisantes, cette propriété entraîne une radiorésistance importante⁴⁵. *In vivo*, elle est critique dans le traitement par RT des tumeurs solides⁴⁶.

Les propriétés des sphéroïdes entraînent des différences importantes lors du test de médicaments comparé aux cellules cultivées en 2D. Plusieurs études ont démontré une résistance au traitement plus importante des sphéroïdes comparé à des cellules cultivées en 2D (EC50 plus élevé)^{28,47}. Les caractéristiques importantes du modèle de sphéroïde dans la recherche en radiobiologie est expliquée en détail dans la partie 2.3.

Caractéristiques	Cellules en monocouche	Sphéroïdes	Tumeurs <i>in vivo</i>
Restriction spatiale des cellules	✓	✗	✗
Gradient de concentration O ₂ , nutriments, déchets métaboliques	✗	✓	✓
Centre hypoxique	✗	✓	✓
Zones biologiques – proliférative, au repos, nécrotique	✗	✓	✓
Niche de cellules souches cancéreuses	✗	✓	✓

Figure 5. – Récapitulatif des propriétés des cellules en monocouches, sphéroïdes et dans les tumeurs *in vivo*. Adapté de [60].

2.2.4 – Modèles de tissus *ex vivo* issus de patients

La culture organotypique de tissus issus de patients permet de conserver les aspects structurels, l'hétérogénéité cellulaire des tissus et le micro-environnement tumoral^{48,49}. Ceci n'est pas le cas dans les modèles de sphéroïdes issus de lignées cellulaires. En effet, au cours des passages les cellules subissent des changements qui modifient leur propriétés⁵⁰. Ce type de culture est particulièrement adapté pour la médecine personnalisée, où la réponse unique d'un patient à un traitement peut être déterminée⁵¹.

Plusieurs études utilisent de fines tranches de tissus frais, avec des épaisseurs entre 250-500 μm ⁴⁸⁻⁵⁰. Ces tissus doivent cependant être sous perfusion continue pour empêcher l'hypoxie, nécessitant des systèmes de culture complexes qui limitent le débit de test de composés^{49,51}. Une nouvelle approche utilisant des tissus microdisséqués de patients, cultivés dans des puces microfluidiques, permet la culture long-terme et limite le problème de l'hypoxie^{51,52}. Cependant, les échantillons de patients sont souvent rares, les modèles de xénogreffes sont longs à mettre en place, et la préparation de ces tissus microdisséqués est complexe et longue. En raison de ces limitations, cette approche, bien que prometteuse pour la médecine personnalisée, n'est pas adaptée pour un criblage rapide de composés.

2.2.5 – Études *in vivo* (PDX = xénogreffe tumorale dérivée de tissu de patient)

Les xénogreffes issues de patients sont des modèles où les cellules d'une tumeur d'un patient sont implantées dans des souris immunodéficientes. Ces cellules sont prélevées directement du patient et injectées dans un animal, conservant les propriétés des tumeurs natives⁵³. Ce modèle nécessite cependant des animaux. La réponse au traitement ne peut donc être déterminée qu'à partir de 2-3 semaines post-chirurgie, ce qui rend le processus long et non adapté au criblage à haut débit^{49,54}.

2.2.6 – Récapitulatif des propriétés et limitations des différents modèles

Les sphéroïdes récapitulent des propriétés importantes des tumeurs *in vivo* comme les gradients d'oxygène, de nutriments et les différentes couches prolifératives. Ils sont de plus peu coûteux et se forment en seulement quelques jours. Plus complexes et représentatifs que les modèles cellulaires 2D, ils sont adaptés au criblage à haut débit de composés (Figure 6).

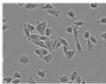
	Culture 2D 	Sphéroïdes 	Tissus <i>ex vivo</i> 	<i>In vivo</i> 
Gradient d'oxygène	✗	✓	✓	✓
Gradient de prolifération cellulaire	✗	✓	✓	✓
Micro-environnement	✗	✗	✓	✓
Hétérogénéité cellulaire	✗	✗	✓	✓
Débit	Haut >1000 compounds	Moyen-Haut 10-100 compounds	Faible	Faible

Figure 6. – Comparaison des différents modèles pour le test d'agents thérapeutiques avec la RT

2.3 – Culture de sphéroïdes

2.3.1 – Culture de sphéroïdes avec échafaudages

La culture de sphéroïdes avec échafaudage permet de fournir un support mécanique aux cellules qui, dans les cas les plus avancés, leur permet de proliférer et de migrer⁵⁵. Le choix de l'échafaudage est crucial dans ce type de culture. Ils peuvent être synthétiques (Polyéthylène glycol, Polyglycolide etc.) ou bien naturels (matrigel⁵⁶, collagène⁵⁷ etc.). Leurs propriétés mécaniques (rigidité, porosité) ainsi que biologiques (compatibilité biologiques, adhésion) sont importantes et influent sur la croissance des cellules⁵⁸. Ces cultures sont souvent utilisées pour effectuer des tests d'invasion où les cellules tumorales envahissent un gel imitant les propriétés de la matrice extracellulaire^{56,59}.

Bien que ces cultures réunissent plusieurs avantages en faisant un modèle physiologiquement pertinent, le manque de méthodes quantitatives pour l'analyse des résultats pose des problèmes (par exemple, le marquage peut être complexe). Les échafaudages sont souvent difficiles à manipuler et la croissance des sphéroïdes y est plus lente qu'en suspension⁶⁰. Cela augmente le

temps et le coût des manipulations⁵⁶ et constitue un frein pour un criblage haut débit d'agents thérapeutiques.

2.3.2 - Culture de sphéroïdes sans échafaudages

2.3.2.1 – Méthodes des gouttelettes suspendues et de flottement forcé

Il existe différentes techniques pour former des sphéroïdes en suspension. Les deux techniques les plus couramment utilisées sont la formation de sphéroïdes par gouttelettes suspendues et par flottement forcé²⁴.

La culture de sphéroïdes par gouttelette suspendue consiste à déposer des gouttes de suspension cellulaire (typiquement 20 μ L) sur une surface en verre. Celle-ci est ensuite retournée et maintenue au-dessus d'un pétri. Les gouttelettes demeurent suspendues grâce à la tension de surface⁴³. Cette technique est simple et la taille des sphéroïdes peut être ajustée en modifiant la concentration de cellules dans la suspension cellulaire. L'un des inconvénients de cette méthode est que les gouttelettes sont difficiles à manipuler, en particulier lors du changement de milieu ou lors de la récolte des sphéroïdes. De plus, il est difficile de contrôler l'uniformité et l'homogénéité des sphéroïdes³⁹, affectant la reproductibilité des expériences.

Dans la culture par flottement forcé, les sphéroïdes se forment sur des substrats non adhérents comme l'agarose. Cette technique est particulièrement utilisée pour former des sphéroïdes en enrobant des plaques de 96 puits, le standard en biologie cellulaire, avec de l'agarose. L'agarose permet d'empêcher l'adhésion des cellules qui vont naturellement s'agréger et former des sphéroïdes⁴³. Cette technique a l'avantage d'être simple et de permettre de former un grand nombre de sphéroïdes²⁴. Les sphéroïdes sont de plus formés dans une plaque de 96 puits qui est compatible avec les appareils d'imagerie et les lecteurs de plaques standards en laboratoire. Cependant, le processus d'enrobage peut être long et laborieux. Des plaques déjà enrobées sont vendues (ex: Corning Inc. Spheroid Microplates, InSphero Inc.) mais elles sont dispendieuses. Les sphéroïdes formés ne sont pas homogènes en taille et la quantité de réactifs utilisée est importante comme chaque sphéroïde est cultivé dans environ 100 μ L de milieu²⁵, augmentant le coût du test de médicament.

2.3.2.2 – Les laboratoires sur puce : miniaturisation de la formation de sphéroïdes

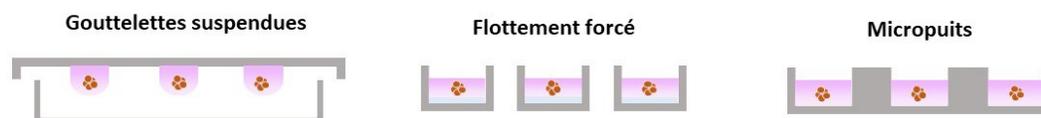
Avec l'essor des systèmes microfluidiques, une nouvelle approche pour la formation de sphéroïdes s'est développée. Les laboratoires sur puces sont des systèmes microfluidiques visant à miniaturiser les tests effectués en laboratoire dans des systèmes de l'ordre du cm, portables et peu coûteux⁶¹. La miniaturisation permet d'économiser les réactifs (agents thérapeutiques, marquages fluorescents etc.) mais aussi de simplifier les procédés⁶². Comme les canaux microfluidiques sont étroits et longs, ils sont caractérisés par un nombre de Reynolds bas ($Re < 1000$ voire dans la plupart des cas $Re < 1$)⁶³. Cela implique que l'écoulement est laminaire. Cela permet d'avoir un contrôle sur le flux de fluide et les contraintes de cisaillements. Ces conditions sont représentatives de l'environnement tumoral *in vivo* : en effet dans l'environnement cellulaire, il n'y a pas d'agitation ou de mélange, le transport de masse se fait exclusivement par diffusion entre les vaisseaux sanguins et les cellules⁶³.

Le développement de la lithographie douce est une avancée majeure pour la fabrication de systèmes microfluidiques⁶⁴. Le principe est le suivant : un élastomère est versé dans un moule qui représente le négatif des structures qui seront représentées dans l'élastomère. Un élastomère largement utilisé dans le domaine de la microfluidique est le Polydiméthylsiloxane (PDMS). L'avantage du PDMS est qu'il est transparent, biocompatible, perméable à l'oxygène et peu coûteux^{63,65}. Pour construire un système microfluidique en PDMS, il suffit de le mélanger avec un agent durcissant, de le verser dans un moule et de le cuire au four pour permettre la polymérisation. Ensuite, le PDMS est retiré du moule et possède le négatif des structures représentées par le moule.

Utilisant cette technique, plusieurs laboratoires sur puces ont été développés pour la formation de sphéroïdes^{26,27,72,73,28,29,66-71}. Pour la majorité, les sphéroïdes sont formés par sédimentation de cellules dans des micropuits de quelques centaines de μm de côté^{26,27,29,66,71-75}. Cette méthode permet de produire un nombre élevé de sphéroïdes facilement et rapidement. La taille des sphéroïdes formés est déterminée par la taille des micropuits et la concentration de cellules dans la suspension cellulaire.

2.3.2.3 – Résumé des différentes méthodes de production de sphéroïdes en suspension

Les avantages et inconvénients de chacune de ces méthodes sont résumés dans la Figure 7.



Homogénéité des sphéroïdes	Bonne	Faible	Bonne
Coût	Peu coûteux	Couteux	Peu coûteux
Production massive pour criblage haut débit	Non adapté	Adapté	Adapté
Manipulation	Difficile	Facile	Facile
Quantité réactifs nécessaire	Faible	Élevée	Faible
Besoin d'infrastructures particulières	Non	Non	Oui
Compatibilité avec systèmes imagerie et plate reader	Oui	Oui	Non

Figure 7. – Comparaison des différentes méthodes de formation de sphéroïdes^{24,25,76}

2.3.3 – L'influence de la taille des sphéroïdes sur la complexité du modèle

Pour tester l'efficacité d'agents thérapeutiques sur des sphéroïdes, il est important de définir la taille des sphéroïdes utilisés, car des sphéroïdes de différentes tailles ne présentent pas les mêmes propriétés⁷⁷. Par exemple, des sphéroïdes ayant un diamètre < 150 μm ne développeront pas de gradients chimiques (nutriments, oxygène etc.). Ces gradients sont habituellement générés dans des sphéroïdes avec des diamètres (D) > 200 μm ⁷⁷. La présence d'un cœur nécrotique est majoritairement trouvée dans les sphéroïdes avec un D > 500 μm ^{22,23,78,79}. De la nécrose au centre de sphéroïdes avec un diamètre > 200 μm a cependant été trouvée sur des coupes de sphéroïdes marquées avec de l'Hématoxyline et de l'Eosine⁸⁰.

Dans cette même étude, il a également été montré que l'expression de gènes clés à la prolifération, à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'hypoxie (cycline D, p21, VEGF), chez de petits et larges sphéroïdes ($D = 200 \mu\text{m}$ et $500 \mu\text{m}$ respectivement), était similaire à celle de cultures

cellulaires 2D en condition d'hypoxie. Ces données indiquent que ces deux types de sphéroïdes ont des régions hypoxiques.

Un désavantage de l'utilisation de sphéroïdes avec des diamètres > 500 µm est le fait qu'ils possèdent une nécrose excessive dû à une condition hypoxique au cœur du sphéroïde⁸¹. Les sphéroïdes de tailles comprises entre 200-500 µm permettent donc d'observer des gradients de métabolites et des conditions hypoxiques tout en évitant une nécrose excessive. Ils sont donc un modèle de choix pour le test d'agents thérapeutique avec la RT.

2.3.4 – Le modèle de sphéroïdes dans la recherche en radiobiologie

L'efficacité des radiations ionisantes sur une tumeur est déterminée par plusieurs paramètres: les interactions inter-cellulaires, l'approvisionnement en oxygène, les processus de réparation de l'ADN et l'induction de l'apoptose⁴⁵. Certains de ces paramètres peuvent être modélisés seulement dans un modèle ayant une conformation tri-dimensionnelle. Sutherland R.M. était le premier à utiliser le modèle de sphéroïdes pour la recherche en radiobiologie^{82,83}. En 1976, il explora l'importance des contacts inter-cellulaires dans la réponse au traitement par irradiation⁸³. Dans un article de 1980, il décrit que les sphéroïdes sont d'importants modèles de tumeurs pour la recherche de nouveaux agents radiosensibilisants⁸². Par la suite, plusieurs études ont investigué les effets des radiations sur les sphéroïdes⁸⁴⁻⁸⁸, démontrant que les sphéroïdes sont plus radiorésistants que les cellules en monocouches. La pertinence des sphéroïdes comme modèle en radiobiologie a donc été démontrée. Pourtant, la plupart des études sur les combinaisons d'agents thérapeutiques avec la RT ont été faites sur des cellules en monocouches^{9,89-95}. Ceci est dû à la simplicité de culture, d'analyse et du faible coût des modèles 2D. Peu d'études ont été réalisées sur des sphéroïdes⁹⁶⁻¹⁰⁰.

Pour promouvoir l'acceptation des sphéroïdes comme modèles précliniques pour le test d'agents thérapeutiques avec la RT, de nouveaux outils permettant de faciliter et d'accélérer la formation de sphéroïdes homogènes et leur analyse sont nécessaires.

2.3.5 – Récapitulatif du processus de sélection du modèle

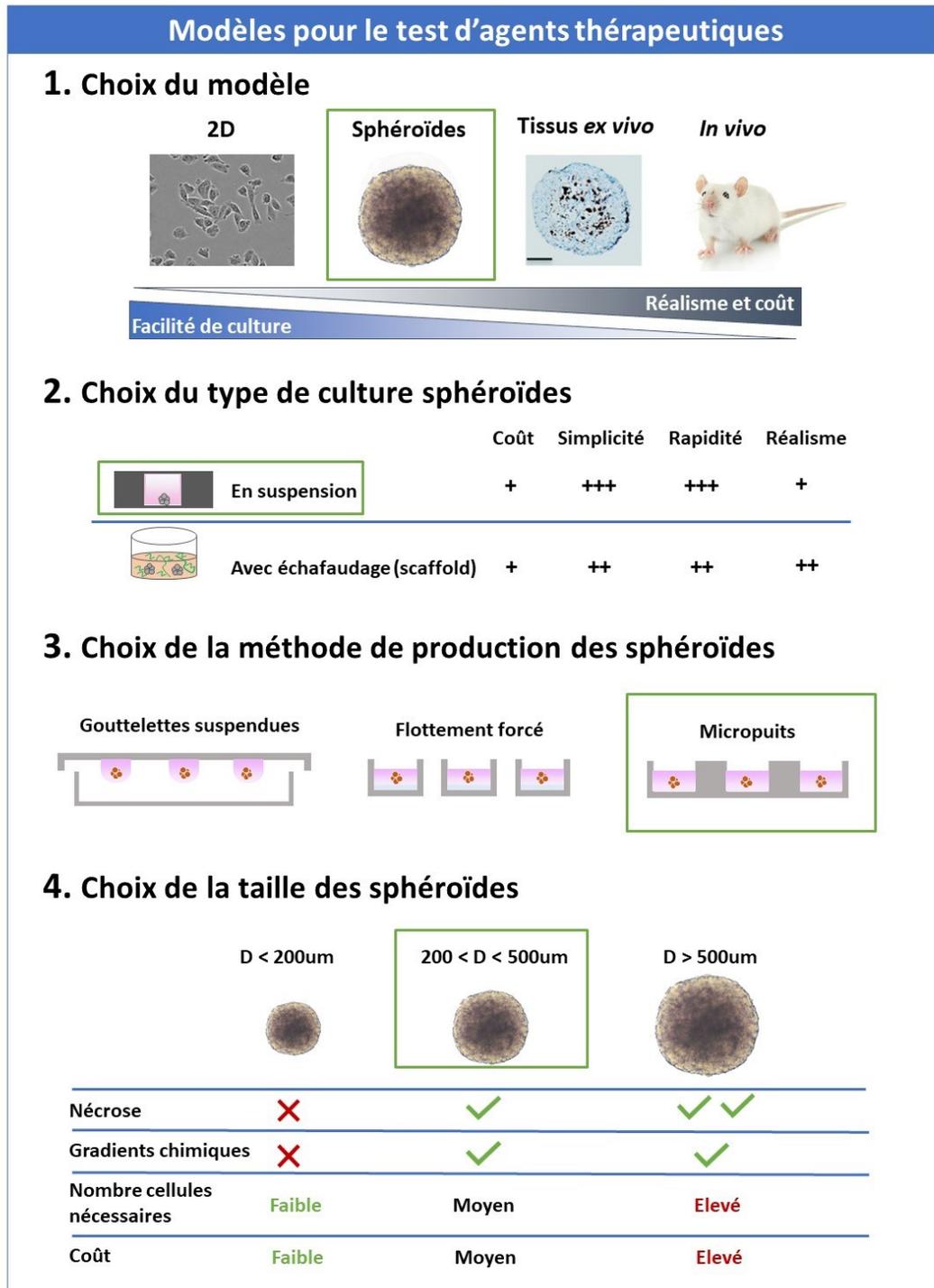


Figure 8. – Choix du modèle cellulaire.

2.4 Systèmes développés pour le test de médicaments sur des sphéroïdes

Plusieurs outils ont été développés pour s'adresser au défi de la culture de sphéroïdes en suspension pour le test rapide et à faible coût de médicaments^{26,27,72,74,75,101}. Pour la première fois, un système permettant le test de combinaisons de médicaments avec la RT a été développé par notre groupe^{72,73}. Dans cette section, nous allons évaluer les différents systèmes développés pour le test de médicaments. Leur potentiel pour le criblage avec la RT sera aussi évalué en se basant sur les critères énoncés ci-dessous.

Les tests clonogéniques sont des essais standards pour analyser la cytotoxicité à long-terme des cellules à la suite de radiations ionisantes¹⁰². Ils mesurent la capacité d'une cellule à former une colonie après un traitement, et donc permettent de tester la capacité des cellules à se diviser indéfiniment¹⁰³. Ainsi, plusieurs sphéroïdes sont nécessaires. À titre d'exemple, l'étude de Patra et al. utilisait 25 sphéroïdes par condition⁷². Un grand nombre de sphéroïdes permet aussi d'avoir suffisamment de répliquas par condition pour mener des études statistiques.

Pour la quantification de l'effet synergique des combinaisons d'agents thérapeutiques avec la RT, plusieurs points de données sont nécessaires pour une étude robuste. Au moins 3 doses de RT doivent être étudiées pour produire des courbes de survie¹⁰³. Plusieurs concentrations d'agents thérapeutiques doivent aussi être testées. Cela renforce le besoin d'un grand nombre de sphéroïdes pour tester différentes concentrations d'agents et de doses de radiation.

Un défi de la recherche en radiobiologie est de s'assurer que les échantillons biologiques irradiés à des doses de radiations différentes soient isolés afin d'éviter des effets *bystander*. Dans l'effet *bystander*, des cellules non irradiées mises en contact direct avec des cellules irradiées ou avec du milieu de culture de cellules irradiées, peuvent avoir des effets similaires à ceux causés par les radiations¹⁰⁴. Les signaux en jeu dans l'effet *bystander* sont encore peu connus¹⁰⁵. Une étude de 2012 montre cependant que la protéine cytochrome c joue un rôle important dans cette réponse¹⁰⁶. Dans cette même étude, il a été observé que la réponse *bystander* augmentait avec la dose de radiation jusqu'à 3 Gy, puis qu'elle diminuait pour des doses plus importantes. Les

sphéroïdes irradiés à des doses de radiation différentes ne doivent pas communiquer via le milieu de culture afin d'éviter que ces effets biaisent l'analyse de la réponse au traitement.

2.4.1 Systèmes utilisant la technique des gouttelettes suspendues

Une étude menée par Tung et al. montre un nouveau système composé d'une série de 384 gouttelettes suspendues pour le criblage à haut débit de médicaments sur des sphéroïdes¹⁰¹ (Figure 9). Ce système vise à pallier les inconvénients de la technique des gouttelettes suspendues standard.

Ce système permet la culture à long terme de sphéroïdes et est compatible avec les robots de manipulations utilisés dans les entreprises pharmaceutiques pour délivrer les liquides (milieu, médicaments etc.). Seulement 20 μL de milieu avec ou sans agents sont utilisés par sphéroïdes, comparé à 50 μL en moyenne pour les plaques de 384 puits standards pour la formation de sphéroïdes. Ce système réunit deux critères importants pour le criblage avec la RT : il permet la synthèse d'un nombre élevé de sphéroïdes et ceux-ci sont cultivés de façon indépendante.

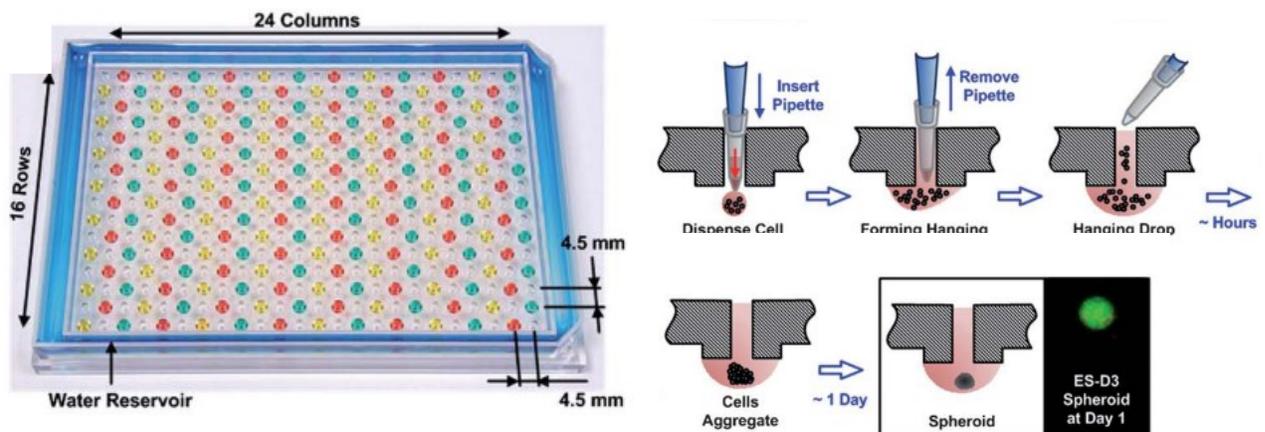


Figure 9. – Plateforme de 384 gouttelettes suspendues¹⁰¹. Reproduit avec la permission de Royal Society of Chemistry, Copyright Clearance Center® [100].

Ce système comporte cependant plusieurs inconvénients. Ce type de culture nécessite des plaques spécialisées contenant une chambre d'humidification²², la récolte des sphéroïdes reste difficile et longue entraînant un stress mécanique important sur les cellules¹⁰⁷. La capacité de ce système à produire un grand nombre de sphéroïdes rapidement requiert des robots

manipulateurs qui sont coûteux, difficile à opérer et sont difficile d'accès dans les milieux académiques et les petites entreprises¹⁰⁸.

2.4.2 Systèmes utilisant la technique des micropuits

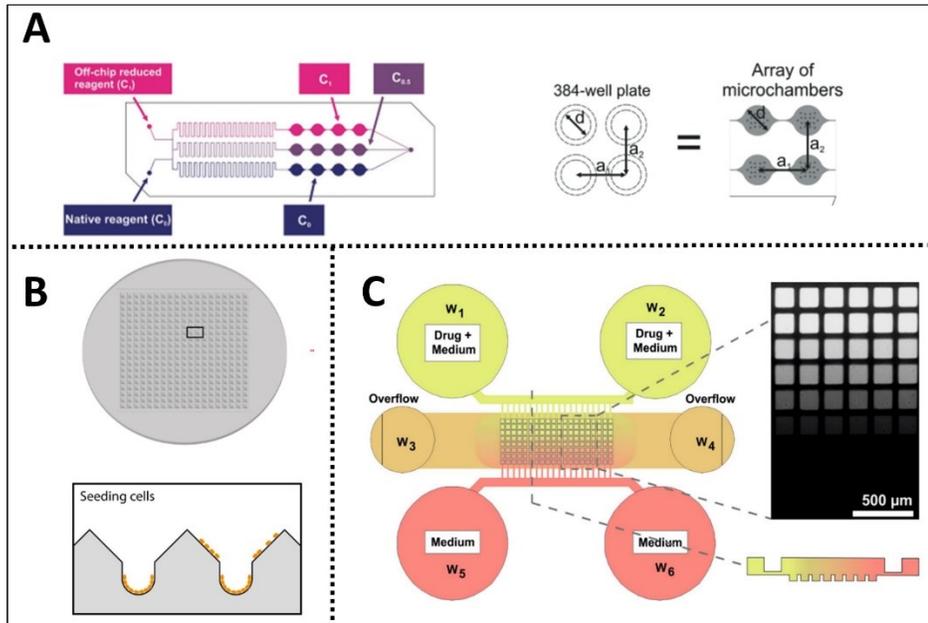


Figure 10. – Systèmes microfluidiques développés pour le criblage d’agents thérapeutiques sur sphéroïdes. A) Le SpheroChip²⁶ développé par Kwapiszewska, K. et al.. Il permet de tester jusqu’à trois concentrations d’agents thérapeutiques. B) Le Spherofilm⁷⁵ développé par Wang, Y. . Chaque film est compris de 361 puits permettant la synthèse rapide de 361 sphéroïdes. C) Système microfluidique de T. Mulholland et al.²⁷. Ce système permet de générer un gradient d’agent thérapeutique à partir de deux entrées. (A), (B), (C) sont reproduits de [26], [75], [27] sous l’accord CC BY 4.0

2.4.2.1 Le SpheroChip

Kwapiszewska et al. ont développé SpheroChip, un système capable de synthétiser 216 sphéroïdes répartis en 12 chambres contenant 18 micropuits²⁶ (Figure 10.A). Le chip permet de générer un gradient de 3 concentrations d’agents thérapeutiques à partir de deux entrées. Chaque condition d’agent est représentée par 4 chambres de 72 sphéroïdes. Un grand avantage de ce système est qu’il permet la culture à long terme de sphéroïdes (>11 jours) et que ces

dimensions correspondent à celles d'une plaque de 384 puits standard, permettant de mesurer les résultats en utilisant un lecteur de plaque. Ce système permet la synthèse de suffisamment de sphéroïdes pour réaliser des tests de survie clonogénique. Cependant, les sphéroïdes formés sont petits ($D < 200 \mu\text{m}$) et leur taille varie jusqu'à 30%, affectant la reproductibilité des expériences. De plus, ce système ne permet de tester que 3 conditions.

2.4.2.2 Le SpheroFilm

Wang et al. ont développé SpheroFilm, permettant de former 361 sphéroïdes facilement en 4 jours dans des micropuits contenus dans un film en silicone⁷⁵ (Figure 10.B). Chaque micropuits a une dimension de $500 \mu\text{m}^3$, permettant la synthèse de sphéroïdes avec un diamètre supérieur à $200 \mu\text{m}$. Ces films peuvent être placés dans des plaques de 24 puits. Les sphéroïdes sont cependant difficiles à manipuler et aucune étude sur l'homogénéité des sphéroïdes n'a été effectuée. De plus, les sphéroïdes contenus dans un SpheroFilm ne peuvent pas être traités avec différentes conditions d'agents thérapeutiques ou de RT.

2.4.2.3 Plateforme générant un gradient de concentration d'agents thérapeutiques

Mulholland et al. ont développé un système capable de générer un gradient de concentration d'agents thérapeutiques (8 concentrations d'agents thérapeutiques au total)²⁷ (Figure 10.C). Ce système permet la formation de 160 sphéroïdes rapidement et facilement. Le gradient permet de tester suffisamment de concentrations pour obtenir des courbes dose-réponse et déterminer les EC50 (concentration de l'agent qui permet de donner la moitié de la réponse maximale). Les sphéroïdes formés sont cependant petits ($50\text{-}100 \mu\text{m}$ de diamètre) et non-uniformes. Les sphéroïdes de différentes conditions sont en contact avec le même milieu. Enfin, la collecte des sphéroïdes différemment traités hors du chip pour des tests de survie clonogénique serait très laborieuse.

2.4.2.4 Autres systèmes développés

Différents systèmes ont été développés pour la culture de cellules en 3D, non sphéroïdes, dans des échafaudages. Certains ont été optimisés pour des criblages à haut débit d'agents thérapeutiques^{109,110}. Ces cultures sont plus représentatives que les cultures 2D mais ne développent pas de gradient de métabolites comme les sphéroïdes.

Plusieurs systèmes ont été développés pour le criblage d'agents thérapeutiques sur des sphéroïdes en utilisant la technique des micropuits pour la formation de sphéroïdes¹¹¹⁻¹¹³, ou la technique de micropatterning^{114,115}. Cependant, ils n'ont pas été optimisés pour le test avec la RT.

2.5 – Solutions précédemment développées dans notre laboratoire pour le test d'agents thérapeutiques avec la radiothérapie

Notre laboratoire a précédemment développé des systèmes microfluidiques pour le criblage de combinaisons d'agents thérapeutiques avec la RT.

2.5.1 – Système de valve magnétique

Un système de valve magnétique a été développé par A.R. Brunet et al⁷³ permettant d'isoler des chambres de culture de sphéroïdes reliées par un même canal. Le système est composé de 12 chambres de culture renfermant 21 micropuits, et d'une membrane flexible en PDMS (Figure 11.A). Quand un aimant est placé en dessous du système pour attirer une tige magnétique, celle-ci vient déformer la membrane en PDMS et fermer le canal. Le principe est illustré dans la Figure 11.B. Une illustration du système en fonctionnement est présentée dans la Figure 11.C et 11.D. Ce système n'a pas été utilisé pour le test de combinaisons d'agents avec la RT. Les sphéroïdes formés dans le système étaient petits ($D < 200 \mu\text{m}$) et n'étaient pas homogènes en raison de la forme en losange des chambres qui empêchait une distribution homogène des cellules. Un autre problème était que 31 aimants étaient nécessaires à son opération. Par conséquent, 31 tiges magnétiques devaient être insérées manuellement pour isoler chaque chambre, rendant son opération laborieuse. Aucune méthode d'irradiation n'a été développée dans cette étude pour pouvoir tester plusieurs doses de radiation sur un même système.

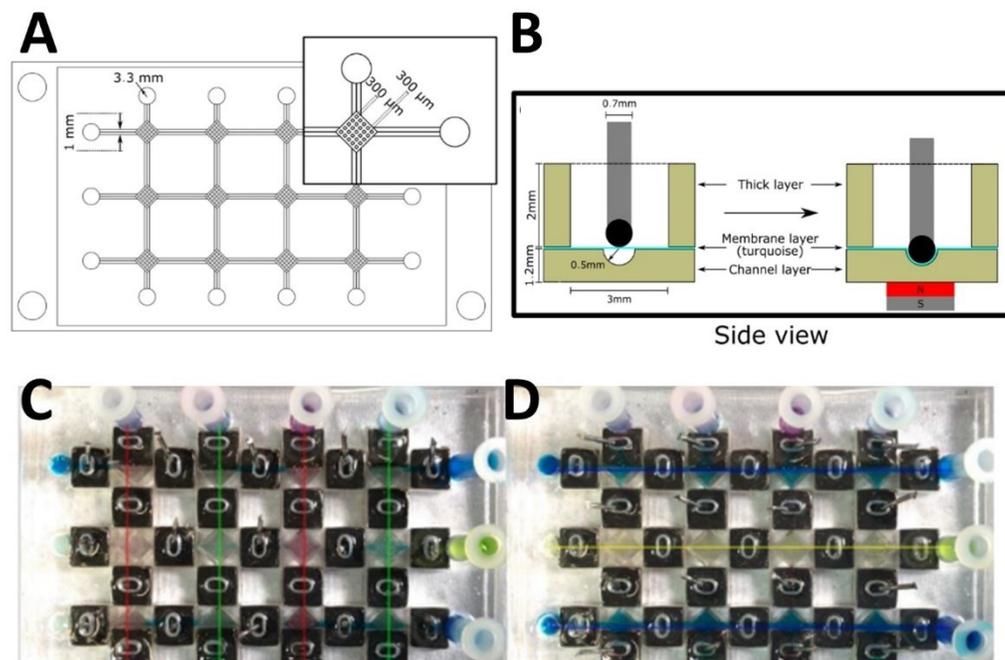


Figure 11. – Système microfluidique développé par Brunet A. et al⁷³. A) Dessin du système et de ces dimensions. B) Illustration du système de valve magnétique intégré dans le système. C) et D) Système en fonctionnement. La trajectoire des différents colorants dépend du nombre de valves activées (tiges magnétiques placées ou non). Reproduit de [73] sous l'accord CC BY 4.0

2.5.2 – Système microfluidique et méthodologie d'irradiation

2.5.2.1 – Design du système

Un autre système, plus simple, a été développé par Patra et al. Il est formé d'un canal comportant 5 chambres de culture de 25 micropuits (Figure 12.A)⁷². Les sphéroïdes formés sont homogènes et leur diamètre moyen est $> 250 \mu\text{m}$. La combinaison de la Doxorubicin (chimiothérapie) avec la RT a été testée dans ce système sur des sphéroïdes de sarcome. L'analyse a été faite par test de survie clonogénique et cytométrie en flux. Une méthodologie d'irradiation a été développée utilisant un accélérateur linéaire. Elle permet d'irradier le système avec 3 doses de radiation différentes (Figure 12.B).

Un désavantage majeur de ce système est que les chambres ne sont pas séparées et que des effets *bystander* peuvent donc se produire et venir biaiser l'analyse de la réponse au traitement

combinatoire. Aucune expérience n'a cependant été faite dans cette étude pour mesurer l'amplitude de ces effets dans le système. Enfin, seuls 3 doses de RT et 1 concentrations d'agents peuvent être testées dans ce système, limitant le débit de criblage.

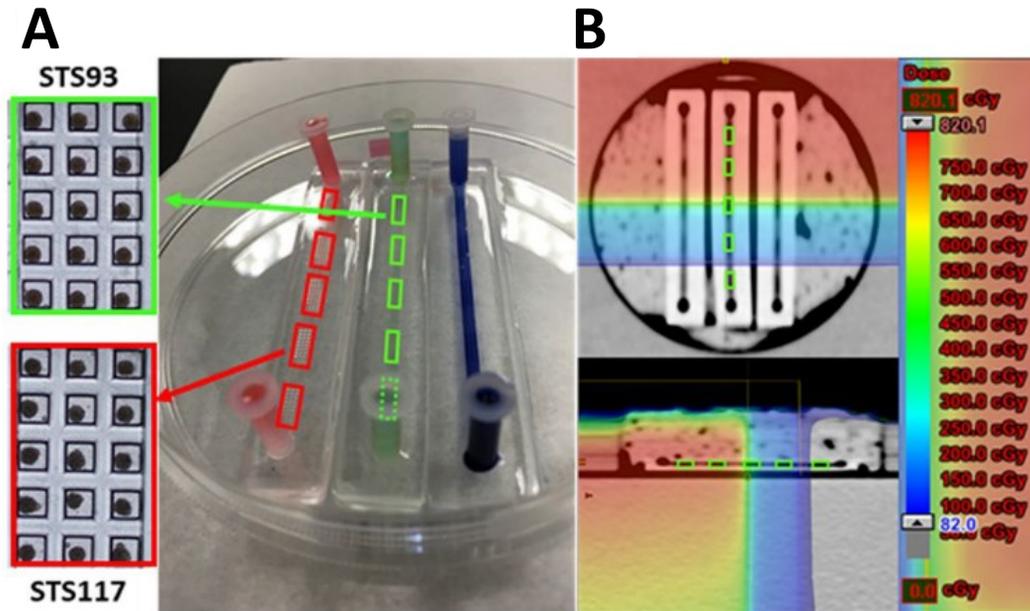


Figure 12. – Système développé par Patra et al. Reproduit de [72] sous l'accord CC BY 4.0

2.5.2.2 – Technique d'irradiation

Les irradiateurs cellulaires communément utilisés dans la recherche ne permettent d'exposer les échantillons qu'à une seule dose de radiation. Pour augmenter le débit expérimental, notre groupe a précédemment développé une technique utilisant le linac (accélérateur linéaire), couramment utilisé en clinique de radio-oncologie, pour irradier le système avec 3 doses de radiation. Les 5 sections ne pouvaient être irradiées avec différentes doses en raison de la *penumbra*.

La *penumbra* correspond à la région du profil de dose où la dose change rapidement de 80% à 20% de la dose maximale (Figure 13)¹¹⁶. Le *penumbra* est due à la taille finie de la source (composante géométrique), à la transmission à travers les *jaws* du collimateur (composante de transmission) et à la dispersion des rayons X.

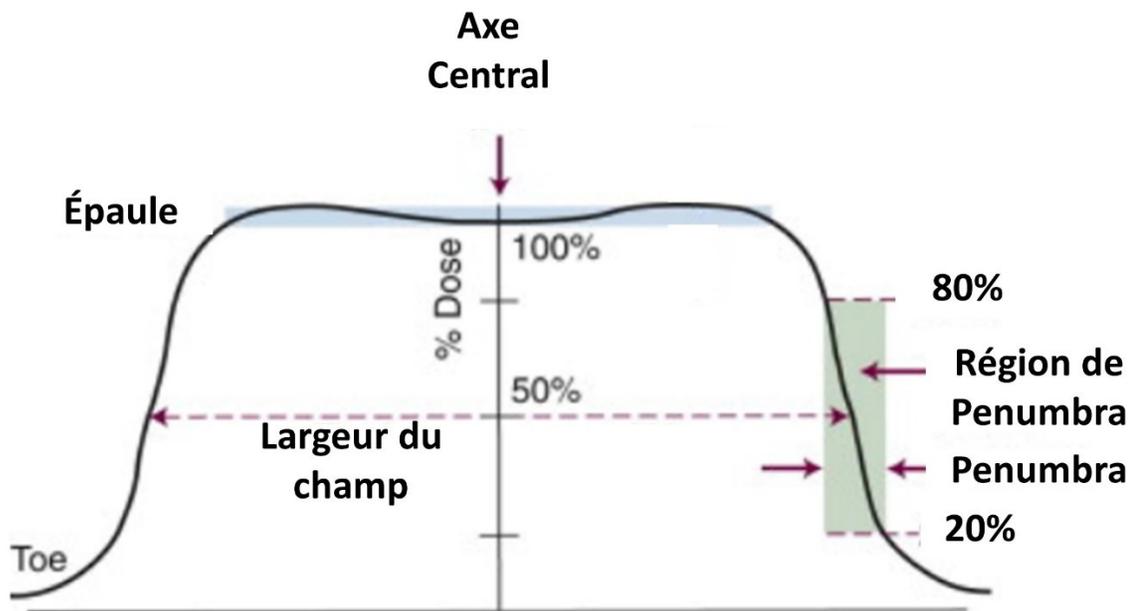


Figure 13. – Profil de la dose d'un traitement par radiothérapie externe. Adapté de [115].

En raison de la *penumbra*, les transitions entre les différentes doses [en cm] étaient importantes. Les 5 sections (chambres de culture) du système ne pouvaient donc pas être exposées à des doses de radiation différentes. Ce principe est illustré graphiquement dans la Figure 14 qui représente le profil de la dose donnée par le linac et un schéma du système microfluidique avec ces 5 sections. On voit que les deux premières sections reçoivent la même dose de 8 Gy, la quatrième 2 Gy et la dernière 0.5 Gy. La transition entre les doses n'est pas abrupte (pente). On observe que la troisième section correspond à la transition entre deux paliers de doses, et la dose reçue par cette section n'est par conséquent pas précise.

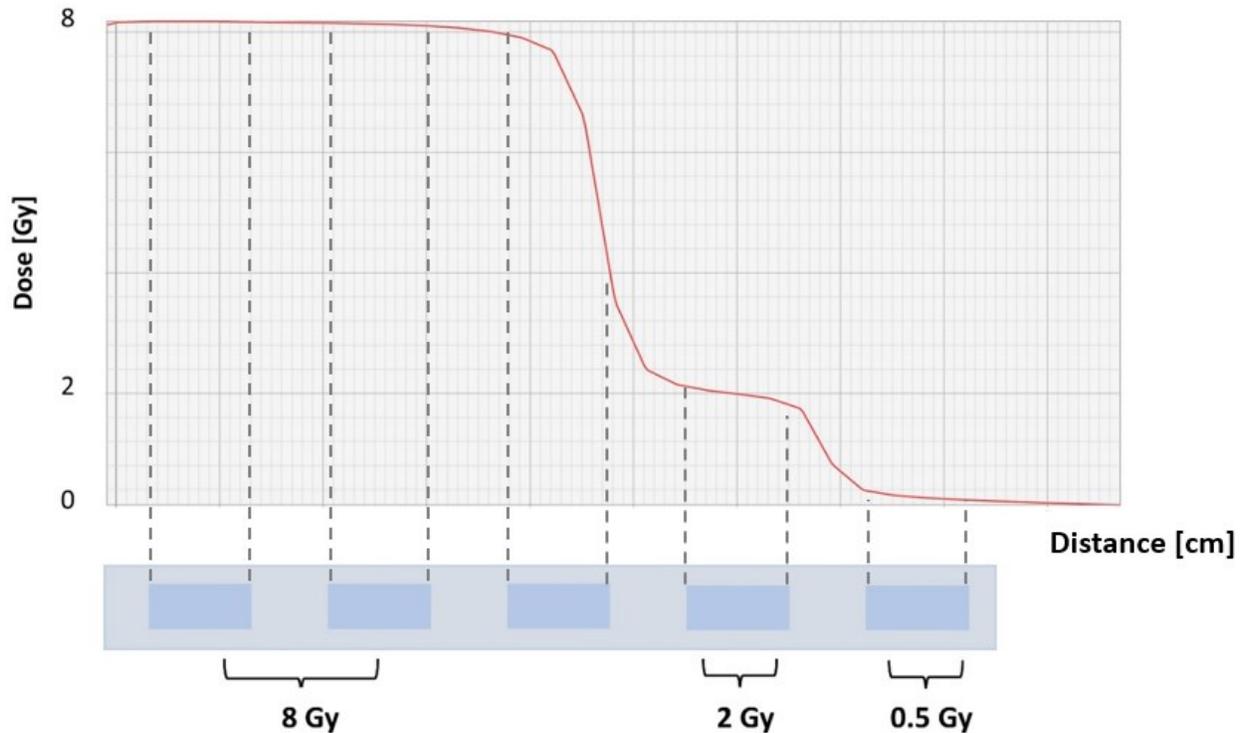


Figure 14. – Modélisation du phénomène de penumbra lors de l'irradiation avec le linac du système de Patra B.⁷². Le système est représenté en bas de la figure. Il est composé de 5 sections. En haut le profil de la dose reçue en Gy sur la longueur du système.

2.6 – Analyse de la réponse au traitement combinatoire

2.6.1 – Test de survie clonogénique

Le test de survie clonogénique mesure la capacité d'une cellule à former une colonie après un traitement et donc évalue leur capacité à se diviser indéfiniment. Le test de survie clonogénique est le standard pour mesurer la mort reproductive des cellules après l'irradiation et il permet de déterminer la radiosensibilité de différentes lignées cellulaires. Ce test est robuste car il englobe tous les types de mort cellulaire, des événements précoces aux événements tardifs.

Une colonie est composée d'un minimum de 50 cellules¹⁰³. Par condition, le nombre idéal de colonie pour permettre une bonne quantification est compris entre 30 et 300. Pour déterminer la viabilité des cellules il faut dans un premier temps calculer l'efficacité de mise en plaque (PE)

qui est définie comme le nombre de colonies formées dans la condition contrôle divisé par le nombre de cellulesensemencées initialement.

$$PE = \frac{\text{nombre colonies (contrôle)}}{\text{nombre de cellulesensemencées (contrôle)}}$$

Ensuite la fraction de survie (SF) est calculée pour les conditions traitées :

$$SF = \frac{\text{nombre de colonies formées après traitement}}{\text{nombre de cellulesensemencées} \times PE}$$

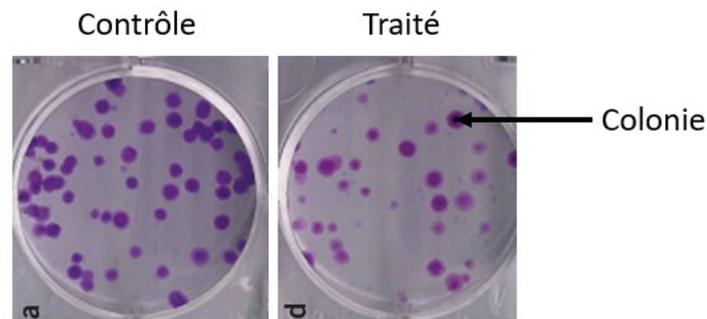
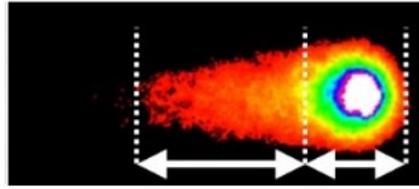


Figure 15. – Formation de colonies dans la condition contrôle et traitée¹⁰³. Les colonies sont fixées puis colorées avec du crystal violet.

2.6.2 – Comet assays

Le *comet assay* est une méthode standard dans l'analyse des dommages à l'ADN de cellules individuelles à la suite d'un traitement génotoxique comme la radiothérapie¹¹⁷. Cette méthode repose sur l'encapsulation de cellules dans un gel d'agarose et leur lyse. Une électrophorèse est ensuite effectuée pour faire migrer les fragments d'ADN. L'ADN non endommagé par le traitement est dans un état condensé et migre lentement. Les fragments d'ADN contenant des cassures induites par le traitement, sont relâchés et moins lourds. Ils migrent donc plus rapidement dans le gel d'agarose. La migration des fragments d'ADN prend la forme d'une comète, où la tête correspond aux fragments d'ADN avec un haut poids moléculaire et la queue correspond aux fragments contenant des cassures¹¹⁸. Le *tail moment* est utilisé pour quantifier la quantité de dommages double brins (*comet assay* neutre) ou double et simple brins (*comet assay* alcalin).



Queue Tête

Figure 16. – Comète formée lors d'un *comet assay*. La queue correspond aux fragments d'ADN qui contiennent des cassures induites par le traitement tandis que la tête correspond aux fragments d'ADN intacts, condensés.

Chapitre 3 – Objectifs de recherche

L'objectif principal de ce projet de maitrise est d'optimiser un système microfluidique pour le criblage d'agents thérapeutiques avec la radiothérapie sur des modèles cellulaires 3D. Il se divise en trois sous-objectifs :

1. Optimiser le système microfluidique de Patra B.⁷² pour augmenter le débit expérimental et prévenir les effets *bystander*

Le système doit réunir plusieurs caractéristiques importantes. Tout d'abord le criblage doit pouvoir être effectué facilement sans l'aide de robots pipeteurs. Ensuite, il doit permettre la synthèse d'un grand nombre de sphéroïdes homogènes en taille. L'homogénéité des sphéroïdes est importante car des sphéroïdes de différentes tailles n'auront pas les mêmes propriétés (section 2.3.3). Le système devra permettre la formation de sphéroïdes avec un diamètre supérieur à 200 μm afin que des gradients chimiques se développent. Plus de 20 sphéroïdes doivent être produits par condition afin de réaliser des tests clonogéniques, pour analyser la mort des cellules à la suite de radiations. La fréquence de changement de milieu doit être au maximum tous les jours pour répondre à des contraintes expérimentales. Un nombre suffisant de conditions doit être testé pour permettre des analyses statistiques robustes (minimum de trois conditions d'irradiations et deux concentrations d'agents thérapeutique). Enfin, le système doit permettre d'isoler les sphéroïdes différemment irradiés pour éviter que des effets *bystander* viennent influencer la réponse au traitement.

2. Développer une nouvelle méthodologie d'irradiation pour diminuer la *penumbra*

La nouvelle méthodologie doit permettre d'irradier un même système avec au moins 4 doses de radiation pour pouvoir réaliser des courbes de survie clonogénique et augmenter le débit expérimental.

3. Tester des combinaisons d'agents avec la radiothérapie sur les sphéroïdes produits dans le système

Afin de valider le potentiel du système pour le criblage, l'efficacité d'agents thérapeutiques avec la RT sur des cellules cancéreuses cultivées en sphéroïdes devra être évaluée en utilisant le système et la méthodologie d'irradiation développés. Des tests de survie clonogéniques seront utilisés pour déterminer l'efficacité du traitement combinatoire. Les tests de survie clonogéniques sont majoritairement effectués avec des cultures 2D. Il s'agira ici d'optimiser le protocole de survie clonogénique et de l'adapter pour des cellules cultivées en sphéroïdes. L'optimisation doit permettre de maximiser la viabilité cellulaire et d'augmenter le débit expérimental.

Chapitre 4 – Article

Statut : Manuscrit prêt à soumettre

Contribution des auteurs :

L'auteur principal (Maeva Bavoux) : Design du système microfluidique, micro-fabrication, formation de sphéroïdes, traitement, analyse par tests de survie clonogénique et *comet assays*, analyses statistiques des résultats, rédaction de l'article scientifique, assistance à Yuji Kamio dans le design du support pour l'orthovoltage et pendant les expériences d'irradiation.

Le second auteur (Yuji Kamio) : Développement de la méthodologie pour l'irradiation avec l'orthovoltage, calibration des temps d'expositions pour obtenir les doses souhaitées, analyse de la dose reçue avec les films Gafchromiques, relecture du manuscrit final.

Le troisième auteur (Emmanuelle Vigneux-Folley) : Développement du plug-in pour l'analyse automatique de la taille des sphéroïdes dans le système microfluidique.

Les auteurs Julie Lafontaine, Ouafa Najyb, Elena Refet : Assistance dans les planifications expérimentales et relecture du manuscrit final.

Shririn Abbasinejad : Supervision de Yuji Kamio dans la réalisation de la méthodologie d'irradiation avec l'appareil d'orthovoltage.

Microfluidic system and kilovoltage X-ray dose modulation technique for the investigation of novel radiosensitizers and radioprotectors

*Maeva Bavoux^{1,2,3}, Yuji Kamio^{4,7}, Emmanuelle Vigneux-Folley⁵, Julie Lafontaine^{2,3}, Ouafa Najyb^{2,3}, Elena Refet^{2,3,6}, Shirin Abbasinejad Enger⁷, Thomas Gervais^{*2,3,5,6} and Philip Wong^{*2,3,4}*

¹Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada

²Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Qc, Canada

³Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Qc, Canada

⁴Department of Radiation Oncology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Qc, Canada

⁵Department of Engineering Physics, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Qc, Canada

⁶Institute of Biomedical Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Qc, Canada

⁷Department of Biomedical Engineering, McGill University, Montréal, Qc, Canada

Corresponding author: Philip Wong.

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. 900 rue Saint Denis, Montréal, Qc, Canada.

Phone: +1 514-890-8254

Email: philip.wong.chum@ssss.gouv.qc.ca

Key words: Radiotherapy, Microfluidic, Drug, Radiosensitizers, Radioprotectors, Repurposing

Total number of figures: 5 + 1 Supp.

4.1 - Abstract

Radioresistance, tumor microenvironment and high toxicity of radiation limit the efficacy of radiotherapy (RT) in treating cancers. This challenge can be tackled by the discovery of new radiosensitizing and radioprotecting agents aiming at increasing the therapeutic index of radiotherapy. Here, we developed a novel microfluidic system capable of growing 336 homogeneous spheroids of soft tissue sarcoma (STS) while preventing bystander effects, and screened approved drugs in combination with RT. An orthovoltage-based dose-modulation technique was used to expose the systems to several radiation doses increasing the experimental throughput. Radiation dose dependent DNA double strand breaks in STS spheroids were observed using comet assays. Analysis of proliferative death using clonogenic assay was performed, and synergy quantified. Using this framework, we demonstrated that a PARP inhibitor, Talazoparib, has radiosensitizing properties on STS when combined with 2 Gy of RT.

4.2 - Introduction

At least 60% of cancer patients will receive radiotherapy (RT) as part of their treatment¹. RT damages DNA directly by ionising DNA, or indirectly through the ionisation of intracellular molecules, production of reactive oxygen species and their subsequent interaction with DNA². These DNA damages include single strand breaks (SSB) and double strand breaks (DSB), which induce various cell death pathways such as apoptosis, necrosis and irreversible cell cycle arrest (senescence).

Soft tissue sarcomas are rare cancers affecting less than 1% of the population. Because of the rarity and the heterogeneity of these cancers, treatment is challenging³. The main modality of treatment consists of surgery with adjunctive radiotherapy⁴. The efficacy of RT in treating cancers is limited by inherent tumor radioresistance, tumor microenvironment, and the radiosensitivity of normal tissues surrounding the tumors⁵. Over the last decades, engineering and imaging advancements vastly improved the accuracy of RT, thereby allowing the delivery of higher RT intensity and improving RT's therapeutic potential. However, few radiosensitizers or radioprotectors, aimed at increasing the therapeutic index of RT through biological manipulations, have been identified⁶.

In recent years, pharmaceutical industry has focused on drug repurposing to accelerate the discovery of new radiosensitizers and radioprotectors⁷. Drug repurposing involves evaluating known molecules (approved or abandoned) for new medical indications other than the one they were originally designed or approved for. As drug design, optimisation and toxicity studies of these molecules are often completed, drug repurposing cuts the time in drug discovery as well as costs by valuing research done to develop molecules that failed clinical trials^{8,9}.

Indeed, 95% of drugs demonstrating anticancer activities in preclinical studies, ultimately fail in clinical trials due to insufficient efficacy or high toxicity¹⁰. Conventional drug screenings are usually done on cell monolayers, which are now recognized as poor predictors of drug efficacy¹¹⁻¹³. Due to the limitations of 2D cancer models, academic researchers and pharmaceutical companies are turning to 3D cellular models¹⁴. Several systems have been developed for drug screening on spheroids, especially microfluidic systems¹⁵⁻²⁰. Miniaturisation of spheroid

formation using microfluidics offer several advantages such as reagents economy and process simplification. However, they have not been optimized for the combinatorial screening of drugs with RT. For example, irradiated cells can communicate with unirradiated cells to induce bystander effects in cellular proliferation and survival, and thus spheroids exposed to different radiation conditions must be isolated^{21,22}. Another experimental challenge, which limits throughput, involves the inability to administer different RT doses to various samples within the same plate or system treated with conventional irradiators.

We have developed a microfluidic system to test combinations of radiotherapy and chemotherapy on spheroids²³. A methodology using the 6 MV beam of a 21EX Varian linear accelerator was developed enabling the irradiation of a system with three different doses homogeneously in every other chamber, utilizing the chambers in between to ramp up the dose. In this study, we optimized the system and irradiation technique by first isolating the culture chambers to prevent bystander effects, and secondly by increasing the number of RT conditions that could be tested per system. A framework was developed to analyze the radiosensitizing and radioprotecting potential of drugs by clonogenic assays using a new orthovoltage-based dose-modulation technique to irradiate our microfluidic system.

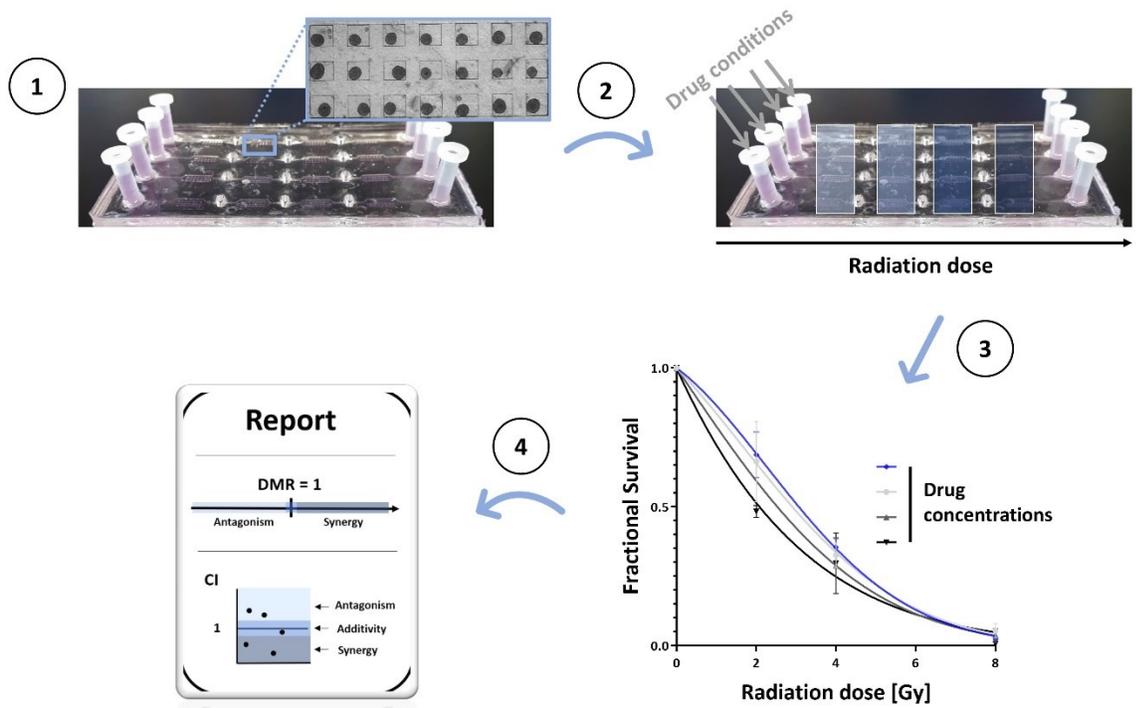


Figure 1: Proposed approach to screen drugs with radiotherapy on spheroids. 1) Spheroids are formed inside the microfluidic system. 2) Spheroids are exposed to drug-RT combinations. 3) Proliferative death following the combinatorial treatment is analyzed with clonogenic assays of dissociated spheroids. 4) Synergy quantification analysis of clonogenic survival values is performed using dose modifying ratios (DMR) and combination indices (CI).

4.3 - Material and Methods

Design of the microfluidic systems

Microfluidic systems were designed using CATIA (Dassault Systemes, France) and made of polydimethylsiloxane (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning, Midland, USA). The design was made following design rules to ensure proper nutrient supply²⁴. The medium change must be done up to 29 hours. A magnetic valve system was integrated in the systems to isolate the culture chambers. The design of the magnetic valve system was done following a previously published study¹⁹. Briefly, channels are closed using a metallic rod which, when attracted to a magnet, deforms a thin PDMS membrane, closing the channels. The system is composed of three layers of elastomer. The bottom layer contains the channels and micro-wells for spheroids formation. The upper layer contains oval holes where metallic rod can be inserted. The middle layer is a 100 μm thick flexible PDMS membrane.

Microfluidic systems fabrication

Molds for the upper and bottom layer of the systems were made of poly-methyl methacrylate (PMMA) using a Computer Numerical Control (CNC) micromilling machine (Roland MDX-40A, Irvine, California, USA). The two layers were then formed by pouring a mix of PDMS with a curing agent at a 10:1 mixing ratio into the molds and by curing them at 80°C for 2h. The 100 μm PDMS membrane was fabricated using a previously published protocol¹⁹. Briefly, the membrane is formed by pouring PDMS mixed at a 20:1 ratio over a silanized glass wafer. Then, the wafer is spin-coated using a Cee 200CBS (Brewer Science, Rolla, Missouri, USA) at 300 rpm for 60 s and cured at room temperature for 72h. Assembly of the device was done by first connecting the bottom layer to the membrane using oxygen plasma treatment, and then to the upper layer. The magnet-holder was 3D-printed. Twelve magnets (B444-N52, K&J Magnetics, Pipersville, Pennsylvania, USA) fit in the holder to actuate the magnetic valve array.

Spheroid formation and observation

Two primary human STS cell lines were used for the experiments (STS117 and STS93), which were previously characterized and described²⁵. Cells were cultured in DMEM:F12 (Thermo Fisher, Ontario, Canada) with 10% bovine serum (Sigma-Aldrich, Ontario, Canada) and 1% pen-strep (Thermo Fisher, Ontario, Canada). Bubble-free filling was achieved by using 100% ethanol, then three washes of 70% ethanol were performed to sterilize the channels. To prevent cell adhesion to the PDMS, the channels were passivated using Pluronic (10 mg/mL, Pluronic® F-108, 542342, Sigma-Aldrich, USA) and incubated overnight in a humidity chamber at 37°C. Afterwards, channels were rinsed three times, with 5 minutes incubation between each rinse using 70% ethanol, HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Thermo Fisher, Ontario, Canada) and finally filled with DMEM:F12.

Spheroids were formed by introduction a solution of 2×10^6 cells/mL (STS117 or STS93 cells) in the channels. Ninety μL of cell suspension was introduced in the plastic inlet and 90 μL were quickly removed in the outlet. This process was repeated 3 times in each direction to ensure uniform cell distribution in the channels. The microfluidic systems were incubated at 37°C and 5% O_2 in an autoclaved pipette tip box with a humidified paper tissue. Medium was changed every 24h. Bright field images were taken once the spheroids formed, two days post seeding.

An ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) plug-in was developed to automatically analyze spheroids diameter. Images were segmented by the following consecutive steps: application of a median blur, threshold operation and contour finding. Areas are converted from pixels to microns and diameters are determined assuming the spheroids are circular. An Excel spreadsheet containing the diameters of all spheroids was exported. Spheroids diameters in the different chambers are presented as means \pm SD for three experiments with 84 spheroids analyzed per replicate.

Irradiation using orthovoltage radiation

A dose-modulation technique using an Xstrahl 150 unit (Xstrahl Inc., Georgia, USA) was developed. The beam energy was 140 kV (HVL = 8.42 mm Al) with additional filtration (1.15 mm Al + 0.2 mm Cu). The field size was collimated by a 15 cm cone (SSD = 25 cm). The beam was calibrated following the "in air" method of AAPM TG-61 protocol²⁶ using an A12 farmer chamber

(Standard Imaging, Wisconsin, USA) with air-kerma calibration factor [cGy/nC] traceable to a national metrology institute standard (NRC, Ottawa, Canada). A support (80% PLA) was printed with an Ultimaker S5 3D printer (Ultimaker, Geldermalsen, Netherlands) and Fusion 360 CAD software (Autodesk Inc., California, USA) to reproducibly place the microfluidic system within the field with 4 notches that secures the system to the cone. In addition, the support includes a slit allowing moving a 3 mm lead collimator plate used to modulate dose-levels using a step-and-shoot technique. Radiation dose increments were achieved by moving the lead plate between three irradiation fields. The dose-rate at the microfluidic system surface was calculated to be 1.71 Gy/min (with a tube current 10 mA) after correcting for an air gap of 1.7 cm. Calculated exposures times were subsequently optimized to yield the desired dose-levels (8 Gy, 4 Gy, 2 Gy and 0.5 Gy) based on EBT3 Gafchromic TM film results, namely 2.8 min, 1.13 min and 0.9 min for the first, second and third irradiation fields performed as a single fraction. EBT3 Gafchromic TM films were analysed using a triple-channel dosimetry method²⁷. A detailed explanation of the irradiation technique and its validation has been published²⁸.

Patra et al.²³ microfluidic systems were irradiated using a cell irradiator (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada Ltd, Ontario, Canada). A single radiation dose per system was delivered.

Drug treatment

Talazoparib (BMN-673) was purchased from MedChem Express (Monmouth Junction, New Jersey, USA). Pazopanib and AZD7762 were purchased from Selleckchem (Houston, Texas, USA). Talazoparib, Pazopanib and AZD7762 were diluted in culture medium at various concentrations. The treatment started two days post-seeding once spheroids were formed. Irradiation was performed 24 hours after treatment induction. Spheroid collection for comet assays was done 30 minutes post-irradiation. Spheroids were collected for clonogenic assays 24 hours post-irradiation.

Clonogenic assay

The microfluidic systems were peeled, and spheroids were collected using PBS (Thermo Fisher, Ontario, Canada). Dissociation into single cells was performed by incubating the spheroids in Trypsin-ETDA 0.25% (Wisent, Quebec, Canada) for 7 minutes at 37°C. For each condition, cells

were counted and seeded in triplicates in 6-well plates: 500, 700, 1500 and 6000 cells for the non-irradiated, irradiated at 2 Gy, 4 Gy and 8 Gy conditions respectively. The plates were left 10 days in the incubator to allow for colony formation. Colonies were fixed and stained using 70% methanol solution containing 0.5% Crystal Violet (Sigma-Aldrich, California, USA). Percentage of survival fraction values were obtained by normalizing the number of colonies counted for each treated condition with the number of colonies in the control. Fractional survival values were obtained by normalizing survival fraction values to non-irradiated controls. Survival curves were fitted with the linear–quadratic model using GraphPad Prism 8.2.0 (Graph-Pad Software Inc, San Diego, California, USA). Combination indices from the Chou-Talalay model²⁹ were computed with CompuSyn (T. C. Chou and N. Martin, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA) for a non-constant ratio. Data are means ± SEM of three biological replicates.

Comet assay analysis

The neutral comet assay (Trevigen Inc, Gaithersburg, Maryland, USA) was performed to detect double strand breaks following irradiation. The spheroids were irradiated two days post-seeding. The comet assay was performed 30 minutes after irradiation. Spheroids were collected from the microfluidic systems using PBS and dissociated using Trypsin-EDTA 0.25% for 7 min. Cells were diluted in DMEMF12 to obtain a cellular suspension of 2-3x10⁵ cells/mL. 90 µL of this solution was added to 300 µL of softened LMA agarose maintained at 37°C. An aliquot of 50 µL was spread onto each comet slide, which were kept at 4°C for 10 minutes to allow the agarose to solidify. Afterwards, slides were first transferred to a cold lysis buffer for one hour, then to a cold 1X Neutral Electrophoresis Buffer for 30 min. The slides were subjected to electrophoresis in a cold 1X Electrophoresis Buffer for 20 minutes at 21V, immersed in DNA precipitation solution for 30 min, in 70% ethanol for 30 min and finally air dried at 37°C for 30 min. Slides were mounted with Prolong™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen™, Grand Island, New York, USA) and DAPI (Sigma-Aldrich, California, USA). Images were taken using an inverted microscope (Zeiss AxioObserver Z1, Carl Zeiss, Jena, Germany) and analyzed using CometScore 2.0 (TriTek Corp., Sumerduck, Virginia, USA). Tail moments are defined as: $Tail\ moment = \frac{Tail\ length \times \% \text{ DNA in the tail}}{100}$.

Data are means \pm SEM for three biological replicates with more than 60 cells analyzed per replicate.

4.4 - Results

Validation of the microfluidic system and irradiation method

The microfluidic system was designed to test up to 16 conditions of drug-radiotherapy combinations (Fig. 2.A). To ensure that culture chambers are isolated, a magnetic valve system was integrated based on our previous work¹⁹. When attracted by a magnet, a magnetic rod deforms the PDMS membrane and thus close the channel (Fig. 2.B) between chambers. A graphic representation of the system's operation is illustrated in Fig. 2.C.

Two days post-seeding, spheroids size-homogeneity inside the device was studied. Spheroid diameters were automatically segmented from bright field images using our custom ImageJ plugin (Fig. 2.D). The diameter was computed from the area assuming spheroids are spherical. The mean diameter of STS117 and STS93 spheroids in each chamber was determined from three independent experiments (Fig. 2.E). No statistical differences were found in spheroid size between chambers for both cell lines (one-way ANOVA). The mean diameter of STS117 and STS93 spheroids was $324 \mu\text{m} \pm 15$ and $257 \mu\text{m} \pm 19$ respectively. The spheroids formed in the different culture chambers were homogeneous in size ($\text{SD} < 15\%$).

Fig. 3.A illustrates the experimental setup of the irradiation process using an orthovoltage unit. The microfluidic system was positioned within the field using a 3D-printed support with 4 notches that secures the system to a 15 cm cone. A 3 mm lead plate was used to modulate the dose-levels. A radiochromic film was placed at the spheroids level (Fig. 3.B) to generate a dose map of the radiation dose received by the cells. Fig. 3.C shows the averaged multichannel dose map of the microfluidic system irradiated with four dose-levels: 0.5 Gy, 2 Gy, 4 Gy and 8 Gy. These radiation dose increments were achieved by moving the lead plate between three irradiation fields delivered as a single fraction. The total irradiation process takes less than 10 minutes. Unirradiated sections received on average 0.5 Gy. Fig. 3.D shows that in a regular radiotherapy dosimetry plan, normal tissues surrounding the tumor receive at least 0.5 Gy.

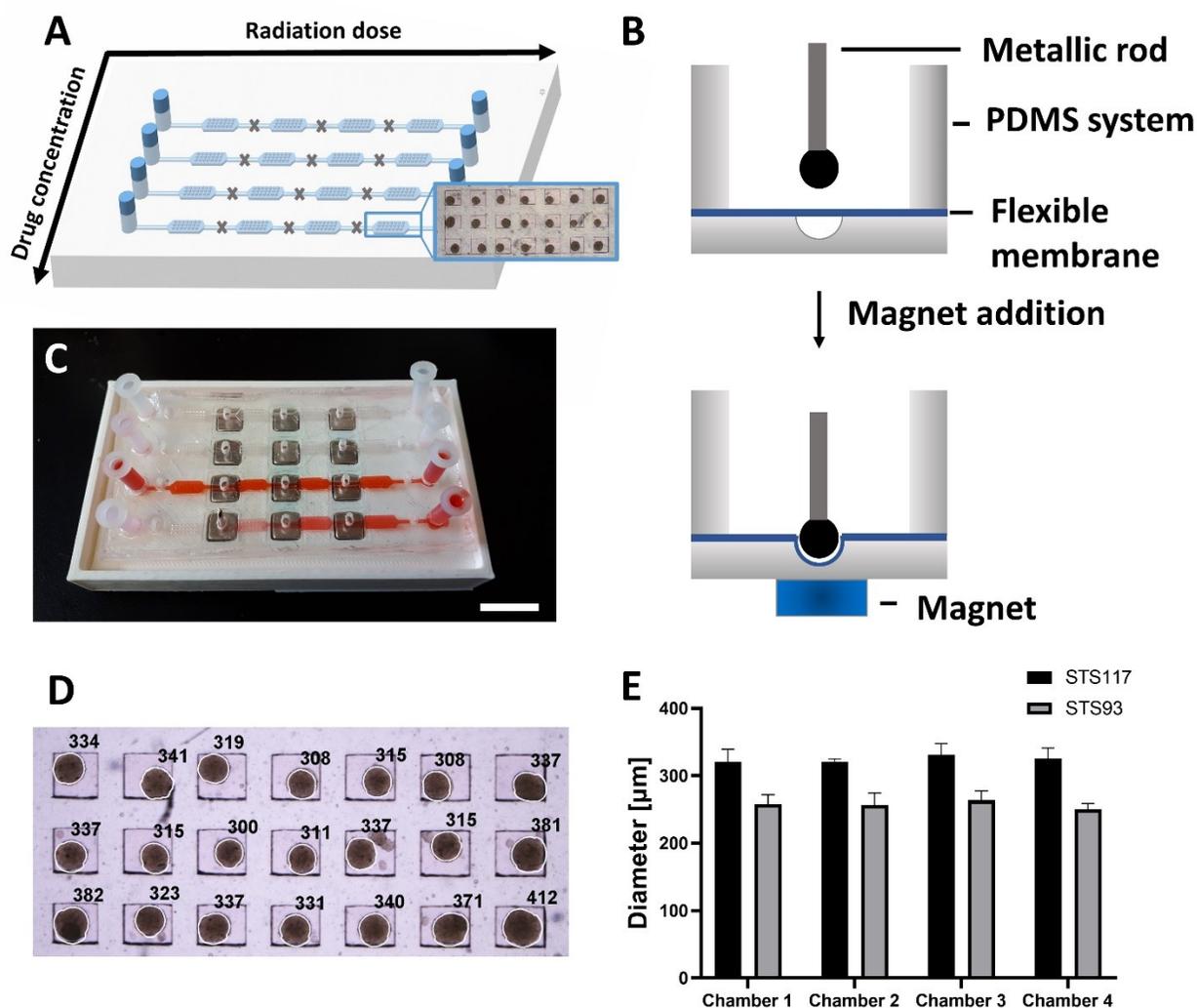


Figure 2: Microfluidic system design. A) 3D design of the microfluidic system and picture of one culture chamber with STS93 (soft tissue sarcoma) spheroids. B) Cross-section of the microfluidic system and illustration of the magnetic valve system operation (adapted from R-Brunet et al¹⁹). Channels are closed using a metallic rod to deform a thin PDMS membrane. C) Example of the system operation. The two bottom channels were filled with ethanol and one was closed using a metallic rod. A red dye was subsequently added. Scale bar = 1 cm. D) Automated segmentation of spheroid diameters in a culture chamber using an ImageJ plugin (described in Materials and Methods). E) Mean diameter of spheroids in the four chambers of the microfluidic system (21 spheroids/chamber). Values are presented as mean \pm SD of three independent experiments ($n = 84$ spheroids per group).

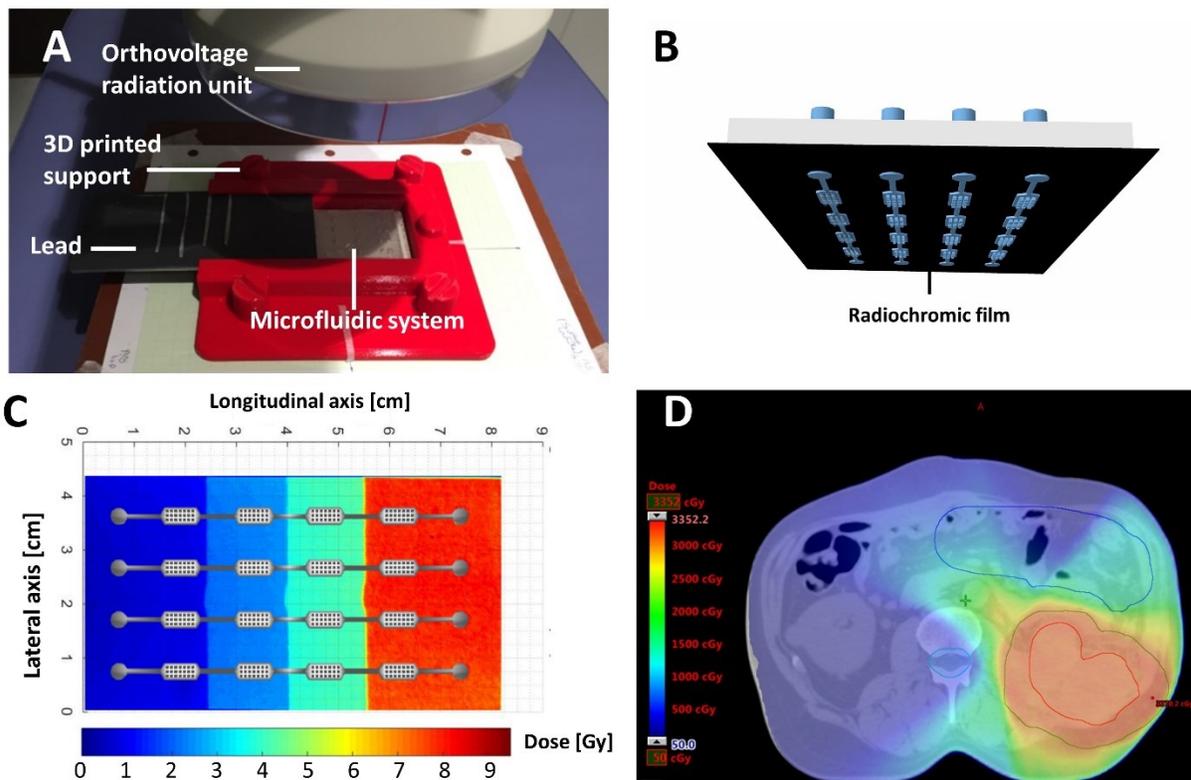


Figure 3: Dose-modulation technique using an orthovoltage beam to irradiate the microfluidic systems. A) Schematic of the irradiation experimental setting. A 3D-printed support includes a slit allowing to move a 3 mm lead collimator plate. The lead plate is used to modulate dose-levels. B) Radiochromic film positioned between the two outer PDMS layers, at the spheroid-level. C) Dose map generated from scanned radiochromic film optical density values. D) Example of radiation doses distribution used in clinic to treat cancer patients. The color map displays radiation doses superior to 0.5 Gy when 8 Gy is aimed at the target (Green contour)

Radiation-induced DNA double-strand breaks analysis

Clonogenic cell survival assay is the gold standard to determine the radiosensitivity of cancer cells³⁰. We examined the clonogenic cell survival of STS117 spheroids that were dissociated 24h post-irradiation (Fig. 4.A). Additionally, we investigated the molecular effect of RT on nuclear DNA using the neutral comet assay, which mainly quantifies DNA double strand breaks (DSB) that leads to RT-related cell deaths. Spheroids were irradiated on-chip with the four radiation doses, and the comet assays were performed 1h post-irradiation. The tail moment, defined as the product of the fraction of DNA in the tail and the tail length, is proportional to the number of double strand breaks³¹. In the fluorescence images of DAPI-stained comets (Fig. 4.B) we can see that the length of the tail increases with the radiation dose. Tail moments of STS117 and STS93 cells, irradiated as spheroids and then immediately dissociated, are shown in Fig. 4.C. Statistical differences were found between the tail moments of the control condition (0.5 Gy) and of spheroids exposed to high radiation doses (4 Gy and 8 Gy) for both cell lines. No statistical differences were found between the tail moments of the two cell lines ($p > 0.05$, unpaired t-test). To assess the potential of the neutral comet assay to compare the radiosensitivity of a cell line, a correlation between STS117 clonogenic cell survival and tail moments was investigated (Fig. 4.D), yielding a high correlation ($R^2 = 0.98$)³².

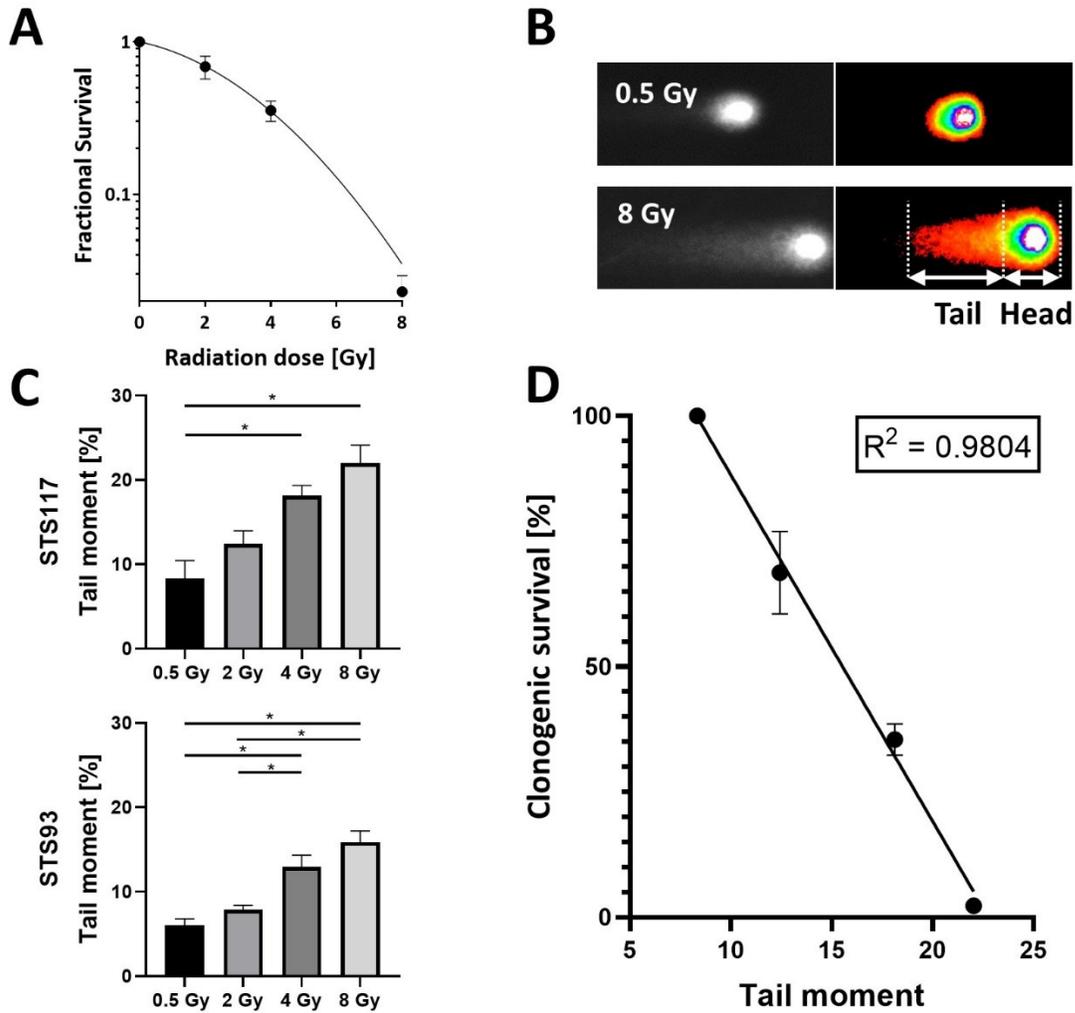


Figure 4: Radiosensitivity of sarcoma cell lines. A) Clonogenic assay of dissociated STS117 spheroids irradiated with four different doses. B) Quantification of DNA double-strand breaks of irradiated soft tissue sarcoma spheroids using the neutral comet assay. Representative fluorescence images of DAPI-stained comets. C) Average tail moment calculated with CometScore 2.0. The analysis was performed with at least 100 comets per condition. Values are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. A one-way ANOVA was used to determine the statistical significance between the different conditions (* $p < 0.05$). D) Relationship between tail moments and clonogenic survival values of STS117 spheroids irradiated with different radiation doses. The data were fitted using a linear trend and the R^2 value was computed.

Investigation of the potential of Talazoparib as a radiosensitizer for STS

The system developed previously by Patra et al.²³ was used to test Pazopanib, a VEGF inhibitor and AZD7762, a checkpoint kinase inhibitor, in combination with radiotherapy on STS117 spheroids (Supp. Fig. 1). Only one drug concentration combined with one radiation dose was tested per system to avoid bystander effects. Proliferative death following treatment was analyzed with clonogenic assays. Surviving fractions values were normalized to the corresponding non-irradiated controls. These values were fitted using a linear quadratic (LQ) model³³. Differences between the LQ curves were identified using the Dose Modification Ratio (DMR)³⁰. D_{50} values represent the radiation doses needed to achieve 50% survival. DMR were calculated as the ratio between D_{50} without and with the radiosensitizer. A $DMR > 1.2$ indicates radiosensitization³⁴. The effect of Pazopanib with RT was additive ($DMR = 0.99$ for a concentration of 20 μM). The effect of AZD7762 with RT was also additive ($DMR = 0.99$ and 0.85 for concentrations of 1 μM and 10 μM respectively).

Using our microfluidic system and dose-modulation irradiation technique, we tested Talazoparib (BMN-673), a PARP-1 inhibitor, in combination with radiotherapy on STS117 spheroids. The experimental timeline is presented in Fig 5.A. Proliferative death following treatment was analyzed with clonogenic assays (Fig 5.B). Surviving fractions values were normalized to the corresponding non-irradiated controls (0.5 Gy). These values were fitted using the LQ model and DMR were calculated for each Talazoparib concentration (Fig 5.C). Radiosensitization was observed at a Talazoparib concentration of 1 μM and 10 μM (DMR of 1.21 and 1.47 respectively). To study the potential of each combination condition to radiosensitize STS117, combination indices were calculated using the Chou-Talalay's model²⁹. $CI > 1$, = 1 or < 1 , represent antagonistic, additive and synergistic effects, respectively. The r value was > 0.95 , showing the goodness of fit of the experimental values with the median-effect principle. All three Talazoparib concentrations (0.5, 1 and 10 μM) exhibited synergistic activity with radiation at 2 Gy ($CI = 0.77$, 0.62 and 0.61 for Talazoparib concentrations of 10, 1 and 0.5 μM respectively). At higher radiation doses, all CI were > 0.95 showing weak or no synergistic activity.

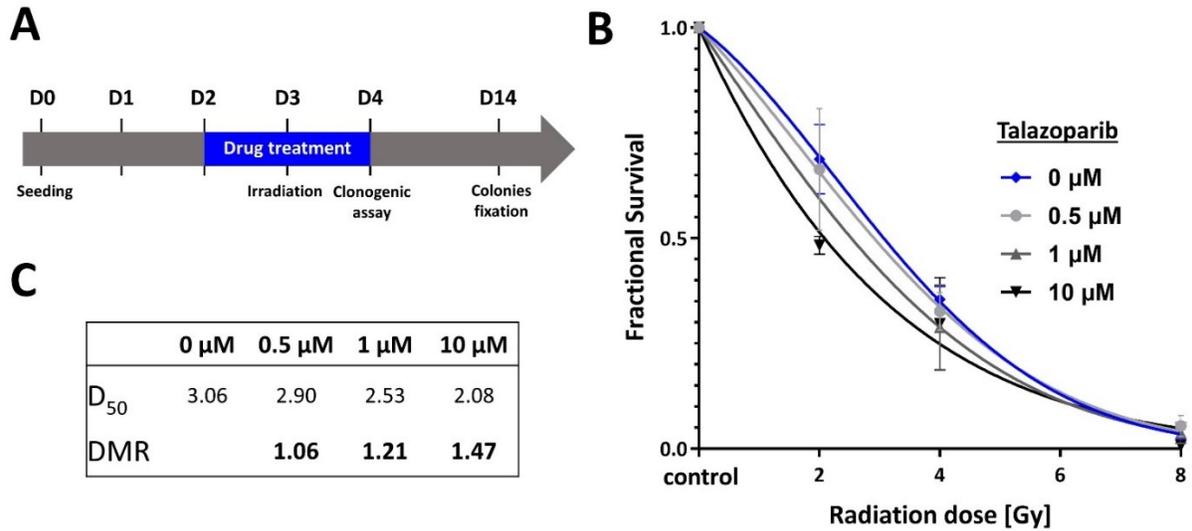


Figure 5: Proliferative death analysis of STS117 spheroids treated with radiation and Talazoparib (PARP inhibitor) using clonogenic assays. A) Experimental timeline. B) Fractional survival. Values were obtained by normalizing survival fraction values to the corresponding non-irradiated controls and fitting them using the linear-quadratic model. C) Quantification of the extent of radiosensitization of each drug concentration with dose modifying ratios (DMR). A DMR > 1.2 indicates radiosensitization. All experimental values are presented as mean \pm SEM of three independent experiments.

4.5 - Discussion

Spheroids exhibit key properties of tumors *in vivo* such as hypoxia. Hypoxia is a major cause of tumor radioresistance³⁵. To investigate whether spheroids represent promising preclinical models to assess radiation sensitizers and protectors, we developed a system 1) allowing efficient seeding of large number of homogeneous spheroids, 2) RT compatible, 3) that contain isolated chambers to proceed with various combinatorial treatments and 4) produces rapid and accurate measurements of treatment efficacy.

A system previously developed was used to test the VEGF inhibitor Pazopanib and the checkpoint kinase inhibitor AZD7762. Pazopanib inhibits angiogenesis and was used in the study as a negative control as the spheroids used aren't vascularized. The effect of Pazopanib and AZD7762 with RT was found to be additive. To prevent bystander effects, only one condition was tested per system limiting the experimental throughput. Therefore, the number of conditions tested was too low to perform further statistical analysis using the Chou-Talalay's model. This was a major drawback of this system.

In this study, we developed a new microfluidic system with a throughput capability of 336 uniformly sized spheroids in 2 days with minimal user intervention. Spheroids are distributed in 16 culture chambers, allowing to test 16 conditions of drug-radiotherapy combinations. Culture chambers are isolated by a magnetic valve system, preventing bystander effects between irradiated and non-irradiated spheroids. The formation of a large number of spheroids with homogeneous sizes is a known challenge using conventional methods such as hanging drops and forced-floating^{12,36}. In our system, cross-comparisons between spheroids from different chambers treated using various combinations can be obtained as spheroids diameters within and between chambers from each system were homogeneous (SEM 15-19 μm). This is important as variation in spheroids sizes may result in microenvironment differences, and dissimilarities in chemical gradients and penetrations³⁷. Moreover, for an equal number of spheroids, our system uses 3x and 15x less reagents than hanging drop arrays³⁸ and ultra-low attachment 96 well plates respectively.

To further enhance the experimental throughput, a methodology was developed to irradiate the microfluidic system with four different radiation doses using an orthovoltage unit. Orthovoltage beams are often used for the treatment of superficial tumors. Orthovoltage X-rays (100-500 kV) are less energetic than common therapeutic linear accelerator beams (4-25 MV) and are attenuated within a few cm. A higher control of the local dose administered is possible with an orthovoltage beam^{6,39}. Exposing samples to different radiation doses is required to produce survival curves using the clonogenic assay, which is the gold standard to determine radiosensitizing properties of therapeutic combinations. Figure 6 shows the validation of the experimental setup using EBT3 Gafchromic TM film measurements, which confirm that the sections were irradiated with four well-delineated uniform dose sections. The mean dose received by the non-irradiated culture chambers was ~0.5 Gy and the entire irradiation delivery process took less than 10 minutes per microfluidic system including the time to move the lead plate. Even though the non-irradiated chambers were protected by the lead plate, side and backscattered X-rays produced small amount of irradiation in those chambers. In a clinical setting, when patients receive radiotherapy, the dose received by normal tissues surrounding the tumor is also not zero. This similarity must also be considered when performing screening of drugs with radiotherapy, especially for toxicity studies where side effects of the treatment on normal tissues surrounding the tumor need to be quantified.

According to the comet assay results, STS117 accumulate more radiation induced DNA double-strand breaks than STS93. Orthovoltage radiations have a low linear energy transfer (LET). With low-LET radiations, the yield of single-strand breaks is 18 times higher than double-strand breaks⁴⁰. Unlike STS93, STS117 cells carry a loss-of-function mutation in its p53 gene, the most commonly mutated gene in cancers, including soft tissue sarcoma⁴¹. Down-regulation of single and double-strand breaks DNA repair mechanisms (homologous recombination and non-homologous end joining) have been found in p53 mutants⁴². These mechanisms lead to an accumulation of unrepaired DNA damage and could explain the difference in radiosensitivity between the two cell lines. The difference in radiosensitivity between the two cell lines was quantified using clonogenic assays in our previous study²³.

A high correlation between clonogenic survival values and tail moments of irradiated STS117 spheroids was found, suggesting that comet assays could be used to predict radiosensitivity of different cell lines. As colonies in clonogenic assays take 10-15 days to grow, comet assays provide an alternative to determine quickly the radiosensitivity of cells.

Talazoparib, a PARP-1 inhibitor, was tested in combination with radiotherapy on STS117 spheroids. PARP-1 is an enzyme involved in the DNA repair of single strand breaks. PARP inhibitors are gaining a lot of attention because of their promising radiosensitizing properties⁴³. Synergistic activity of Talazoparib with radiotherapy was found at concentrations of 1 μ M and 10 μ M. An in-depth analysis of synergy with the Chou-Talalay model demonstrated that the synergy with these two Talazoparib concentrations was most important at 2 Gy, the dose most commonly used in conventional radiotherapy in clinic⁴⁴. At higher radiation doses (4 Gy and 8 Gy), where higher level of DNA DSB was observed, Talazoparib didn't radiosensitize the soft tissue sarcoma cells. Hence, with increasing amount of DNA DSB, the impact of inhibiting DNA repair through Talazoparib is reduced, suggesting that the strategy of combining radiotherapy with PARP inhibition may have better therapeutic index when conventional radiation dosage is given. The concentrations of Talazoparib needed to radiosensitize STS117 cells cultured in 3D spheroids are above the clinical maximum tolerated dose (1mg/mL daily, corresponding to a maximum observed plasma concentration of 0.043 μ M)⁴⁵. In comparison, Soni et al.⁴⁶ suggested that Talazoparib at 20 nM (concentration 20x lower than the one used in this study) is enough to induce radiosensitizing properties in an Ewing sarcoma cell line (CHLA9) cultured in 2D. It will be intriguing to follow the evolution of combining PARPi with radiotherapy in Ewing's sarcoma as previous clinical trials evaluating PARP inhibition as monotherapy in Ewing's sarcoma did not demonstrate therapeutic benefit despite strong pre-clinical data based on 2D assays using MTT or colorimetric cell death assay.

4.6 - Conclusion

Screening on 3D models better predicts the efficacy *in vivo*. Indeed, most studies have found that spheroids exhibit higher drug and radio-resistance compared to 2D cell cultures, in part due to difficulty in drug penetration and hypoxia. Indeed, hypoxia in the spheroid's core limit the production of reactive oxygen species following irradiation leading to radio-resistance^{47,48}. Analysis by clonogenic assays, compared to colorimetric assays, is more robust and remain the gold standard to translation into *in vivo* studies.

We developed for the first time a complete methodology for the screening of drugs in combination with RT on 3D cellular models. A microfluidic system is used to easily produce and treat spheroids. Then, systems are irradiated at different radiation doses using a dose-modulation technique. Finally, radiosensitivity analysis is done by clonogenic assays of dissociated spheroids and synergy quantification using dose modifying factors and Chou-Talalay combination indices. Using this methodology, radiosensitizing activity of Talazoparib on soft tissue sarcoma cells was found at 2 Gy. These results suggest that a combination of fractionated radiotherapy with Talazoparib would be optimal. Indeed, radiotherapy given everyday at 2 Gy would not only first enhance the radiosensitizing properties of Talazoparib, but also contribute to improve the limited drug penetration in tumors. Spheroids mimics drug resistance caused by the inability of drugs to penetrate tumor tissues and reach tumor cells. By exposing tumors to small radiation doses everyday, cell death located at the tumor's surface would be promoted, and thus Talazoparib could penetrate deeper into the tumor. A combination of Talazoparib with radiotherapy is currently evaluated in phase I clinical trial for gynecologic cancers⁴⁹. This emphasizes the potential of Talazoparib as a radiosensitizer.

More research is required to increase experimental throughput by performing on-chip live and dead assays to assess drug radiosensitizing properties. Increasing our spheroid model physiological relevance is also under investigation. Spheroids could be formed using primary cell cultures derived directly from patient tumor biopsies. This is important as biological properties of immortalized cell lines change from the original tumor's over passages⁵⁰. Combination of

immunotherapy with radiotherapy could therefore be investigated, as immunotherapy could increase tumor radiosensitivity by promoting antigen presentation.

Overall, the developed drug-radiotherapy screening approach has all the requirements to repurpose drugs with radiotherapy.

4.7 - References

1. Chen, H. H. W. & Kuo, M. T. Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.18409
2. Wang, H., Mu, X., He, H. & Zhang, X. D. Cancer Radiosensitizers. *Trends in Pharmacological Sciences* (2018). doi:10.1016/j.tips.2017.11.003
3. Mangoni, M. *et al.* Soft tissue sarcomas: new opportunity of treatment with PARP inhibitors? *Radiol. Medica* **124**, 1–8 (2018).
4. Wong, P. *et al.* Combining targeted agents with modern radiotherapy in soft tissue sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **106**, 16–18 (2014).
5. Tian, J. *et al.* Radioprotection and cell cycle arrest of intestinal epithelial cells by darinaparsin, a tumor radiosensitizer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **87**, 1179–1185 (2013).
6. Lin, S. H. *et al.* Opportunities and challenges in the era of molecularly targeted agents and radiation therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 686–693 (2013).
7. Strittmatter, S. M. Overcoming Drug Development Bottlenecks With Repurposing: Old drugs learn new tricks. *Nat. Med.* (2014). doi:10.1038/nm.3595
8. Pushpakom, S. *et al.* Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery* (2018). doi:10.1038/nrd.2018.168
9. Bertolini, F., Sukhatme, V. P. & Bouche, G. Drug repurposing in oncology-patient and health systems opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology* (2015). doi:10.1038/nrclinonc.2015.169
10. Hutchinson, L. & Kirk, R. High drug attrition rates - Where are we going wrong? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 189–190 (2011).
11. Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C. & De Boer, J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology* (2013).

doi:10.1016/j.tibtech.2012.12.003

12. Benien, P. & Swami, A. 3D tumor models: History, advances and future perspectives. *Futur. Oncol.* **10**, 1311–1327 (2014).
13. Langhans, S. A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–14 (2018).
14. Hirschhaeuser, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **148**, 3–15 (2010).
15. Mulholland, T. *et al.* Drug screening of biopsy-derived spheroids using a self-generated microfluidic concentration gradient. *Sci. Rep.* **8**, 1–12 (2018).
16. Kwapiszewska, K., Michalczuk, A., Rybka, M., Kwapiszewski, R. & Brzózka, Z. A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening. *Lab Chip* **14**, 2096–2104 (2014).
17. Patra, B. *et al.* A microfluidic device for uniform-sized cell spheroids formation, culture, harvesting and flow cytometry analysis. *Biomicrofluidics* **7**, 1–11 (2013).
18. Ruppen, J. *et al.* A microfluidic platform for chemoresistive testing of multicellular pleural cancer spheroids. *Lab Chip* (2014). doi:10.1039/c3lc51093j
19. Brunet, A. R., Labelle, F., Wong, P. & Gervais, T. Reconfigurable microfluidic magnetic valve arrays: Towards a radiotherapy-compatible spheroid culture platform for the combinatorial screening of cancer therapies. *Sensors (Switzerland)* **17**, (2017).
20. Marimuthu, M. *et al.* Multi-size spheroid formation using microfluidic funnels. *Lab Chip* **18**, 304–314 (2018).
21. Seymour, C. B. & Mothersill, C. Radiation-induced bystander effects — implications for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 158–164 (2011).
22. He, M. *et al.* Cytochrome-c mediated a bystander response dependent on inducible nitric oxide synthase in irradiated hepatoma cells. *Br. J. Cancer* **106**, 889–895 (2012).

23. 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).
24. Rousset, N., Monet, F. & Gervais, T. Simulation-assisted design of microfluidic sample traps for optimal trapping and culture of non-adherent single cells, tissues, and spheroids. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
25. Wong, P. *et al.* Prognostic microRNAs modulate the RHO adhesion pathway: A potential therapeutic target in undifferentiated pleomorphic sarcomas. *Oncotarget* **6**, 39127–39139 (2015).
26. Ma, C. M. *et al.* AAPM protocol for 40-300 kV x-ray beam dosimetry in radiotherapy and radiobiology. *Med. Phys.* **28**, 868–893 (2001).
27. Mayer, R. R. *et al.* Enhanced dosimetry procedures and assessment for EBT2 radiochromic film. *Med. Phys.* **39**, 2147–2155 (2012).
28. Kamio, Y. *et al.* Validation of an orthovoltage based high-throughput microfluidic lab-on-a-chip radiobiological platform using EBT3 Gafchromic™ film multichannel dosimetry. in (The Canadian Organization of Medical Physics (COMP) Annual meeting (In press), 2019).
29. Chou, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research* (2010). doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947
30. Subiel, A., Ashmore, R. & Schettino, G. Standards and methodologies for characterizing radiobiological impact of high-Z nanoparticles. *Theranostics* **6**, 1651–1671 (2016).
31. Olive, P. L. & Banáth, J. P. The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* **1**, 23–29 (2006).
32. Moneef, M. A. L. *et al.* Measurements using the alkaline comet assay predict bladder cancer cell radiosensitivity. *Br. J. Cancer* **89**, 2271–2276 (2003).
33. Unkel, S., Belka, C. & Lauber, K. On the analysis of clonogenic survival data: Statistical alternatives to the linear-quadratic model. *Radiat. Oncol.* **11**, 1–11 (2016).

34. Schilling, D., Garrido, C., Combs, S. E. & Multhoff, G. The Hsp70 inhibiting peptide aptamer A17 potentiates radiosensitization of tumor cells by Hsp90 inhibition. *Cancer Lett.* **390**, 146–152 (2017).
35. Olive, P. L. & Durand, R. E. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.* **13**, 121–138 (1994).
36. Lin, R. Z. & Chang, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal* (2008). doi:10.1002/biot.200700228
37. Riffle, S., Pandey, R. N., Albert, M. & Hegde, R. S. Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer* **17**, (2017).
38. Tung, Y. C. *et al.* High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* (2011). doi:10.1039/c0an00609b
39. Duinkerken, C. W. *et al.* Orthovoltage for basal cell carcinoma of the head and neck: Excellent local control and low toxicity profile. *Laryngoscope* **126**, 1796–1802 (2016).
40. Watanabe, R., Rahmanian, S. & Nikjoo, H. Spectrum of Radiation-Induced Clustered Non-DSB Damage – A Monte Carlo Track Structure Modeling and Calculations. *Radiat. Res.* **183**, 525–540 (2015).
41. Das, P. *et al.* High prevalence of p53 exon 4 mutations in soft tissue sarcoma. *Cancer* **109**, 2323–2333 (2007).
42. Menon, V. & Povirk, L. in *Mutant p53 and MDM2 in cancer* 321–326 (Springer, 2014).
43. Lesueur, P. *et al.* Poly-(ADP-ribose)-polymerase inhibitors as radiosensitizers: a systematic review of pre-clinical and clinical human studies. *Oncotarget* **8**, 69105–69124 (2017).
44. Bourhis, J. *et al.* Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet* **368**, 843–854 (2006).
45. de Bono, J. *et al.* Phase I, dose-escalation, two-part trial of the PARP inhibitor talazoparib

in patients with advanced germline BRCA1/2 mutations and selected sporadic cancers. *Cancer Discov.* **7**, 620–629 (2017).

46. Soni, A. *et al.* Inhibition of Parp1 by BMN673 Effectively Sensitizes Cells to Radiotherapy by Upsetting the Balance of Repair Pathways Processing DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 2206–2216 (2018).
47. Khaitan, D., Chandna, S., Arya, M. B. & Dwarakanath, B. S. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; implications for tumor therapy. *J. Transl. Med.* **4**, 1–13 (2006).
48. Hinz, G. & Dertinger, H. Increased radioresistance of cells in cultured multicell spheroids. *Radiat. Environ. Biophys.* **21**, 255–264 (1983).
49. Lakomy, D. S., Urbauer, D. L., Westin, S. N. & Lin, L. Phase I Study of the PARP inhibitor talazoparib with radiation therapy for locally recurrent gynecologic cancers. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* (2019). doi:10.1016/j.ctro.2019.12.005
50. Ben-David, U. *et al.* Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature* **560**, 325–330 (2018).

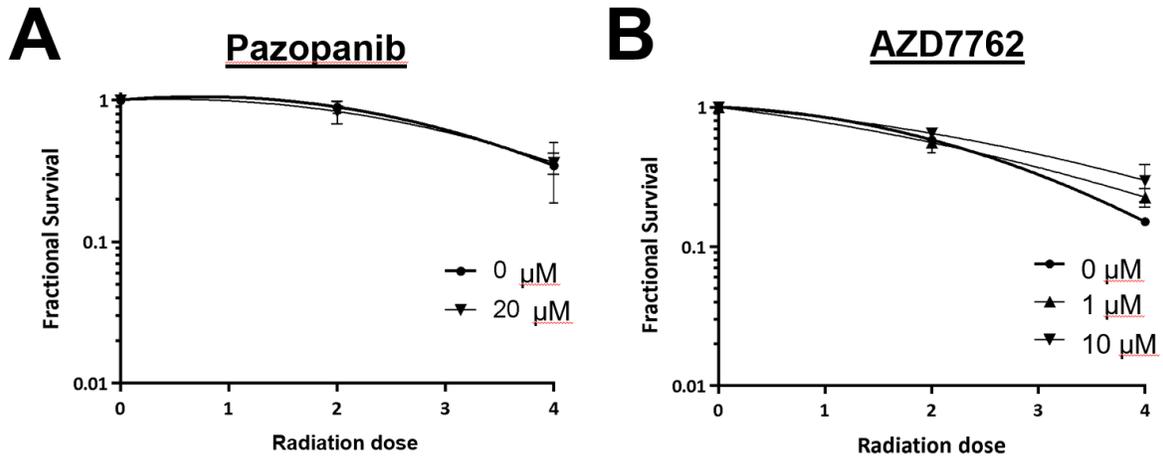
4.8 - Acknowledgements

We acknowledge fellowship support from the TransMedTech Institute (Apogée fund) and the Montreal Cancer institute (Canderel Fund). Y. Kamio is supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The authors would like to thank Sylvain Bélanger for his assistance in designing the 3D-printed support.

4.9 - Author contributions

All the listed authors have agreed to all of the contents. P. Wong and T. Gervais are the co-principal investigators of the study. M. Bavoux was master student. She designed the microfluidic device, performed the biological experiments, and analyzed the results under the supervisions of the PIs. Y. Kamio a Ph.D student performed and analyzed EBT3 film measurements to validate the dosimetry and assisted in the radiation delivery of the devices under the supervision of S.A. Enger. M. Bavoux, T. Gervais and P. Wong wrote the paper with input from all authors. P. Wong and T. Gervais supervised all aspects of the work.

4.10 - Supplementary figure



Supplementary Fig 1. Proliferative death analysis of STS117 spheroids formed in Patra et al. systems and treated with radiation and A) Pazopanib (VEGF inhibitor) or B) AZD7762 (CHK1, CHK2 inhibitor) using clonogenic assays.

Chapitre 5 – Discussion générale

5.1 – Réponse aux objectifs

5.1.1 – Optimisation du système microfluidique

Le premier objectif de ma maîtrise était d'identifier les faiblesses du système développé précédemment dans le laboratoire par Patra et al.⁷². Pour cela l'évaluation de deux agents, le Pazopanib et l'AZD7762, combinés à la RT, a été effectuée dans ce système. Chaque système a été exposé à une seule dose de radiation pour empêcher des effets *bystander* comme les chambres de cultures sont connectées par le même canal. Par conséquent, une seule concentration d'agent thérapeutique avec une unique dose de radiation pouvait être testée par système, limitant le débit expérimental. Un autre inconvénient du système est que son design ne permet pas l'utilisation d'une multi-pipette, ralentissant les étapes d'ensemencement des cellules et de traitement. De plus, la distance et la forme des chambres de culture ne correspondaient pas aux dimensions des plaques standards (24, 96 et 384 puits). Le système n'était donc pas compatible avec l'utilisation d'outils classiques en recherche en biologie comme la microscopie (Incucyte) et les lecteurs de plaques.

Un nouveau système a été conçu pour pallier ces faiblesses. Le premier objectif était d'augmenter le débit expérimental et d'isoler les chambres de culture. Cet objectif a été réalisé avec le développement d'un système microfluidique permettant de tester 16 conditions d'agents systémique avec la radiothérapie. Les effets *bystander* sont évités en isolant les chambres de culture grâce à un système de valves magnétiques. Ce système s'inscrit dans la continuité des études de Patra et al.⁷² et R-Brunet et al.⁷³. La figure 15 compare ces deux systèmes avec le système final :

	Système Brunet A.R.	Système Patra B.	Système final
Nombre de conditions agent thérapeutique-RT	12	1	16
Isolation des chambres de culture	Oui	Non	Oui
Sphéroïdes homogènes en taille	Non	Oui	Oui
Sphéroïdes avec un diamètre supérieur à 200 µm	Non	Oui	Oui

Figure 17. – Comparaison des différents systèmes développés dans le groupe : celui de Brunet A.R.⁷³ et de Patra B.⁷² avec le système final. Le nombre de conditions d’agents thérapeutiques-RT pouvant être testé avec le système de Patra est de 1 en supposant qu’on veuille éviter les effets bystander entre les chambres de culture.

Un autre point important est que, dans le cas du système final, le système de valves magnétiques ne nécessite que 12 aimants au lieu de 31 pour le système de Brunet A.R. Cela simplifie grandement les procédés car seules 12 tiges doivent être insérées pour isoler les différentes chambres de culture. La forme des chambres de culture a été modifiée pour favoriser l’homogénéité des sphéroïdes (chambres rectangulaires au lieu de chambres en forme de losange).

La culture de sphéroïdes est simple et rapide : 336 sphéroïdes homogènes peuvent être formés dans le système en l’espace de deux jours. L’espace entre les différentes entrées permet l’utilisation d’une multi-pipette, facilitant et accélérant les étapes d’ensemencement des cellules et des changements de milieu.

Le design du système correspond aux dimensions d’une plaque de 96 puits standard. La distance entre les chambres d’un même canal est la même que la distance entre deux puits (espacés d’un d’une plaque de 96 puits (Figure 16). La taille des chambres de culture correspond avec la taille des puits d’une plaque de 96 puits (indiqués par des cercles en pointillés sur la Figure 16.B). L’espacement entre les différentes branches du système correspond à la distance verticale entre deux puits d’une plaque de 96 puits.

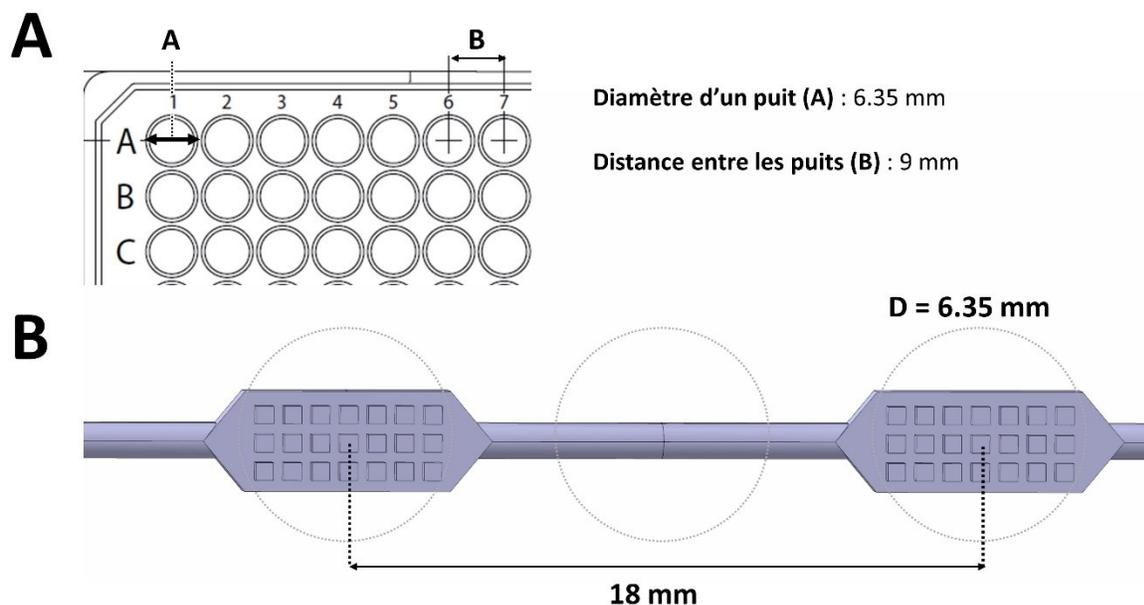


Figure 18. – *Design du système. (A) Schéma d'une plaque de 96 puits Corning® avec des puits en U indiquant le diamètre d'un puit (diamètre A) et la distance entre les puits (distance B). (B) Design du système avec des dimensions correspondant aux plaques de 96 puits. La distance entre deux chambres de cultures est indiquée et les cercles en pointillés représentent la position des puits d'une plaque de 96 puits.*

5.1.2 – Développement de la méthodologie d'irradiation

Le deuxième objectif était le développement d'une méthodologie d'irradiation permettant de diminuer la *penumbra* afin d'augmenter le nombre de doses de radiation pouvant être testée par système. Cet objectif a été atteint en développant une nouvelle méthodologie utilisant un appareil d'orthovoltage, couramment utilisé en clinique pour le traitement des tumeurs superficielles. Dans l'étude de Patra B., un accélérateur linéaire (linac) avait été utilisé pour irradier les systèmes. Les canaux de ce système sont courts afin de limiter la quantité de réactifs et de cellules nécessaire à son opération. La distance entre les chambres de cultures étant petite (inférieure à 15 mm), la méthodologie d'irradiation utilisée doit minimiser la *penumbra* afin de pouvoir exposer chaque chambre à une dose différente. En utilisant le linac, les paliers entre les différentes doses étaient importants. Par conséquent, le système pouvait être exposé à 3 doses

de radiations différentes, et les 5 chambres le composant ne pouvaient pas recevoir des doses de radiation différentes.

Dans cette étude, la *penumbra* a été diminuée de trois façons. Premièrement, sa composante géométrique a été diminuée en réduisant la distance entre le système et la source (distance SSD). La distance SSD était de 100 cm avec le linac contre 15 cm avec l'appareil d'orthovoltage. Ensuite, l'utilisation d'une plaque de plomb et de rayons X de plus faible énergie (6 MV pour le linac contre 140 KV pour l'orthovoltage) a permis de réduire la composante de transmission de la *penumbra*. En effet, les rayons faiblement énergétiques de l'orthovoltage ont de la peine à traverser la plaque de plomb. Cette méthodologie permet donc d'irradier les systèmes avec 4 doses de radiation différentes augmentant le débit expérimental et permettant la production de courbes de survie clonogéniques.

L'énergie des rayons d'orthovoltage utilisés (140 KV) est plus faible que celle des rayons traditionnellement utilisés en radiobiologie (250 KV). Les linac, couramment utilisés en clinique, utilisent des rayons avec des énergies de l'ordre du MV. En comparaison avec les appareils d'orthovoltage, ils sont 10% moins efficaces pour tuer les cellules cancéreuses¹⁴². Malgré les différences d'efficacité biologique entre les différents appareils d'irradiation, les données biologiques générées seront consistantes si un même appareil de radiothérapie est utilisé pour toutes les expériences de criblage. En plus d'avoir l'avantage de réduire la *penumbra*, l'utilisation d'appareils d'orthovoltage pour le criblage de combinaisons d'agents thérapeutiques avec la RT est très pratique comme ces appareils sont présents dans la majorité des cliniques et sont très peu utilisés (contrairement aux linac). Les appareils cliniques sont de plus fréquemment calibrés, de façon rigoureuse, avant leurs utilisations cliniques.

5.1.3 – Analyse des traitements combinatoires

Le dernier objectif était de tester des agents thérapeutiques avec la radiothérapie. Une méthodologie complète a été développée utilisant les tests de survie clonogénique pour déterminer l'efficacité d'agents thérapeutiques avec la RT. Pour quantifier l'efficacité du traitement combinatoire, et déterminer s'il est simplement additif ou si une synergie est présente, deux approches statistiques complémentaires ont été utilisées. La première consiste à

calculer les *dose modifying factors* (DMR). Un DMR > 1.2 ou un DMR < 0.8 indiquent respectivement une activité synergique de l'agent avec la RT ou une interaction antagoniste. Cet indice permet de déterminer l'efficacité globale du traitement combinatoire. Pour comprendre quelles sont les doses de radiation qui ont permis une meilleure radiosensibilisation des cellules à différentes concentrations d'agents thérapeutiques, et pour aller plus en profondeur dans l'analyse, le modèle de Chou-Talalay a été utilisé. Le modèle de Chou-Talalay repose sur le principe du *median-effect*. Le nombre théorique de données de combinaisons minimal pour utiliser ce modèle est de 4. Avec le système développé par Patra B. nous avons 4 données combinatoires (1 μ M - 2 Gy, 1 μ M - 4 Gy, 10 μ M - 2 Gy, 10 μ M - 4Gy). Avec seulement 4 points, il n'est pas possible de vérifier l'ajustement des données expérimentales au modèle *median-effect*. Ainsi, l'analyse était peu robuste et sujette à de grandes variations. Avec le système développé, 9 combinaisons peuvent être testées (0.5 μ M, 1 μ M, 10 μ M en combinaison avec 2, 4 et 8 Gy). L'ajustement des données au modèle peut être vérifié et on s'assure donc que les valeurs d'index de combinaisons trouvées sont robustes.

5.2 – Mise en place d'un service de criblage : défis

Une méthodologie complète pour le criblage d'agents thérapeutiques avec la RT sur des sphéroïdes, utilisant notre système microfluidique et une nouvelle technique d'irradiation, a été développée. Il reste cependant plusieurs défis associés à la mise en place d'un service de criblage au débit utilisant notre méthodologie.

5.2.1 – Comment trouver les bons agents à cribler?

5.2.1.1 – Les voies de signalisation et facteurs du micro-environnement impliqués dans la toxicité de la RT

Un des enjeux pour la mise en place d'un service de criblage est de sélectionner des agents à tester en combinaison avec la RT. Cette stratégie s'inscrit dans un contexte de repositionnement.

Les dommages à l'ADN causés par les radiations constituent la première source de mortalité cellulaire à la suite d'un traitement par radiation¹⁴³. Les agents thérapeutiques inhibant les processus de réparation de l'ADN sont alors de potentiels radiosensibilisants et pourraient être

utilisés pour augmenter l'index thérapeutique de la RT. Dans cette étude, nous avons exposé des sphéroïdes de STS à une combinaison d'inhibiteur de PARP (Talazoparib) et de RT. PARP est une enzyme impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN simple brin¹⁴⁴. De nombreuses études ont précédemment démontré que les inhibiteurs de PARP ont des propriétés radiosensibilisantes⁸⁹. La combinaison du Talazoparib avec la radiothérapie est présentement évalué en essai clinique phase I¹⁴⁰. Ainsi, les agents thérapeutiques inhibant les mécanismes de réparation de l'ADN sont des candidats intéressants pour le criblage avec la RT en utilisant notre méthodologie.

La toxicité de la RT est aussi modulée par d'autres voies de signalisation moléculaire et par des facteurs du microenvironnement tumoral¹⁴⁵. Comme vu dans l'introduction, l'hypoxie joue un rôle important dans la résistance au traitement par radiation. L'utilisation d'agents ciblant les cellules hypoxiques pourrait augmenter l'efficacité thérapeutique de la RT.

La combinaison de l'immunothérapie avec la radiothérapie est aussi prometteuse comme les dommages induits par les radiations permettent aux cellules cancéreuses d'exposer des antigènes spécifiques à la tumeur à leur surface¹⁴⁶. Ces antigènes sont reconnus par le système immunitaire (cellules cytotoxiques T) qui s'engage par la suite à l'élimination de la tumeur. La tumeur est souvent cachée du système immunitaire et la radiothérapie permet donc de la révéler et de faciliter son élimination.

Une liste non-exhaustive des mécanismes biologiques dont l'altération pourrait augmenter l'efficacité thérapeutique de la RT, ainsi que les agents thérapeutiques les ciblant, est présentée dans le tableau 1. Les agents ciblant ces mécanismes biologiques pourraient être des candidats intéressants pour le criblage préclinique avec la RT en utilisant notre système.

Cibles biologiques	Exemples d'agents	Potentiel bénéfique du traitement	Statut des essais cliniques
Signalisation intra-cellulaire			
EGFR	Cetuximab, gefitinib, erlotinib	Cible radiorésistance des cellules tumorales	Phase 2-3
mTOR	Everolimus, temsirolimus		Phase 1/2
Métabolisme du cancer et Hypoxie			
Hypoxie tumorale	Tirapazamine evofosfamide	Cible radiorésistance des cellules tumorales	Phase 3
	Nimorazole		Phase 3
	Metformin	Cible radiorésistance des cellules tumorales et métastases	Phase 2-3
Réparation ADN			
PARP	Olaparib, Talazoparib, Velaparib	Cible radiorésistance des cellules tumorales et utilise la létalité synthétique	Phase 1
Immunothérapie			
PD-1 and PD-L1	Pembrolizumab, nivolumab	Augmentation de la réponse des cellules T et utilisation de l'effet abscopal	Phase 1-3
Cytokines	Interleukine-2, interferon	Activation des cellules immunitaires et utilisation de l'effet abscopal	Phase 1-3
Radioprotection			
Dérivés réactifs de l'oxygène	Amisfostine	Protection des tissus normaux des effets des radiations	Phase 2-3

Tableau 1. – Liste non exhaustive de cibles biologiques pour augmenter l'efficacité thérapeutique de la RT. Des exemples d'agents thérapeutiques développés, ciblant ces mécanismes, sont décrits ainsi que leur potentiel bénéfique pour le traitement par RT, et leur avancement dans les essais cliniques. Adapté de [142].

5.2.1.2 – Librairies de données

Plusieurs librairies de données intègrent de grandes collections de données d'études pharmacologiques publiées. Ces librairies pourraient être utilisées pour la sélection d'agents thérapeutiques à tester avec la RT. La librairie de donnée PharmacDB¹⁴⁷ est l'une des plus grande librairie développée. Les courbes doses-réponses d'agents thérapeutiques avec plusieurs centaines de lignées cellulaires sont disponibles. La librairie de données Cancerrxgene¹⁴⁸, elle, permet en plus de trouver les *Volcano Plot* associés avec des mutations/agents thérapeutiques précis. Un *Volcano Plot* permet notamment de visualiser l'effet d'une mutation particulière dans le génome avec la réponse des cellules à un agent thérapeutique. Un exemple est donné dans la Figure 17. Chaque cercle représente l'interaction entre un agent et une mutation, et la taille du cercle est proportionnelle au nombre de lignées cellulaires mutantes criblées pour chaque agent.

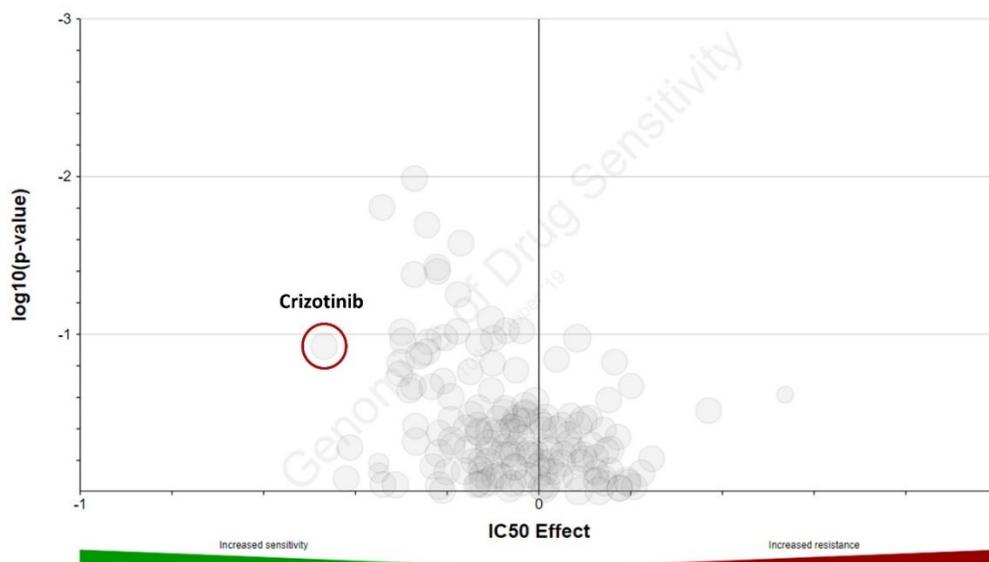


Figure 19. – *Volcano Plot* issu de Cancerrxgene. L'axe y correspond au négatif du log de la valeur p. Les points de donnée avec la grande valeur p (haut degré de signification) apparaissent en haut du graphique. Dans ce graphique on peut observer que la mutation sélectionnée (ici BRCA2) est associée avec une plus grande sensibilité aux agents thérapeutiques représentés dans le coin supérieur gauche du graphique (exemple: Crizotinib).

Un exemple d'utilisation des *Volcano Plot* pour la sélection d'agents thérapeutiques à combiner avec la RT est le suivant : plusieurs gènes sont impliqués dans la réparation de l'ADN (Figure 18). Des mutations dans ces gènes-là peuvent affecter la réparation de l'ADN et mener à l'accumulation de dommages dans les cellules. La radiothérapie entraîne aussi de nombreuses cassures dans l'ADN des cellules et une accumulation subséquente de dommages. Ainsi, les agents thérapeutiques dont l'efficacité augmente quand ces mutations sont présentes pourraient avoir des propriétés intéressantes quand combinés avec la radiothérapie et pourraient donc être sélectionnés pour être criblés avec la RT.

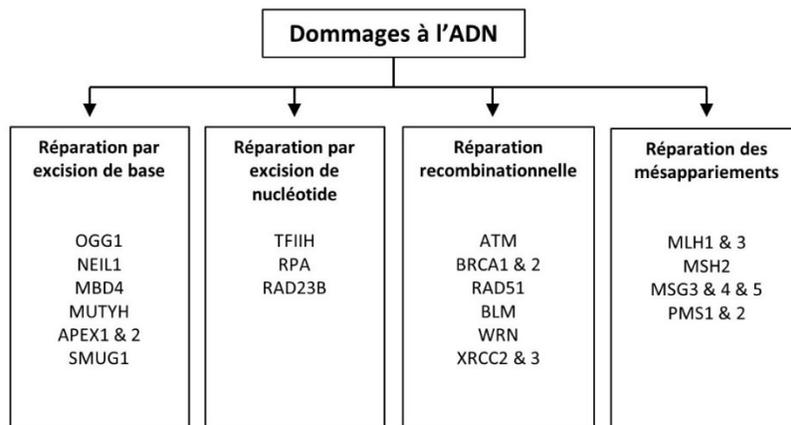


Figure 20. – Gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (adapté de Wikipédia :

https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_repair)

5.2.2 – Défis techniques : automatisation et augmentation du débit expérimental

Un autre enjeu dans la mise en place d'un service de criblage utilisant le système microfluidique développé ainsi que la méthodologie d'irradiation, est l'augmentation du débit expérimental. Le test de survie clonogénique est la méthode choisie pour déterminer la radiosensibilisation de cellules par un agent thérapeutique. Cependant, ce processus est encore laborieux comme les sphéroïdes doivent être extraits du système et dissociés. De plus, les colonies mettent dix jours à se former. Une façon plus rapide de déterminer l'effet du traitement combinatoire est par

imagerie. L'Incucyte est un type d'appareil d'imagerie qui permet de suivre de façon automatique et en temps réel, des cellules marquées ou non de façon fluorescente. Ces marqueurs pourraient être utilisés pour quantifier l'effet du traitement combinatoire sur les sphéroïdes dans le système en utilisant des marqueurs de vie et de mort (Calcéine / Propidium Iodide). Cet appareil est adapté aux plaques standards (382, 96, 24, 12 et 6 puits) ainsi qu'aux lames de verre. Par conséquent, ils ne sont pas par défaut adaptés pour l'imagerie de systèmes microfluidiques. Notre système, lui, a cependant été développé pour correspondre aux dimensions d'une plaque de 96 puits.

Des tests réalisés avec ce système avec un fond en PDMS ont montré que l'auto-focus ne se faisait pas sur les sphéroïdes mais sur les imperfections présentes dans le PDMS, résultant en des images floues (Figure 19).



Figure 21. – *Images en fluorescence de sphéroïdes STS117 formés dans le système microfluidique avec un fond en PDMS et marqués avec de la Calcéine (marqueur de vie).*

Une façon de contourner ce problème est de remplacer le bas du système par une lame de verre. Des tests ont été effectués sur une section du système avec le fond en verre par l'étudiante Emmanuelle Vigneux Folley sous la supervision de Maeva Bavoux et Elena Refet (Figure 20). On observe que l'image des sphéroïdes est nette et que l'imagerie est donc possible.

Plusieurs aspects restent cependant à optimiser pour pouvoir utiliser cette approche pour augmenter le débit de criblage de combinaisons avec notre système. Tout d'abord, les cellules ont tendance à adhérer à la lame de verre donc un pré-traitement du verre serait nécessaire. Pour

pouvoir imager toutes les chambres du système, de grandes lames pourraient être utilisées. Enfin, les résultats du traitement combinatoire avec les marqueurs fluorescents de mort et de vie doivent être comparés aux résultats obtenus par test de survie clonogénique pour s'assurer de la robustesse de la méthode.

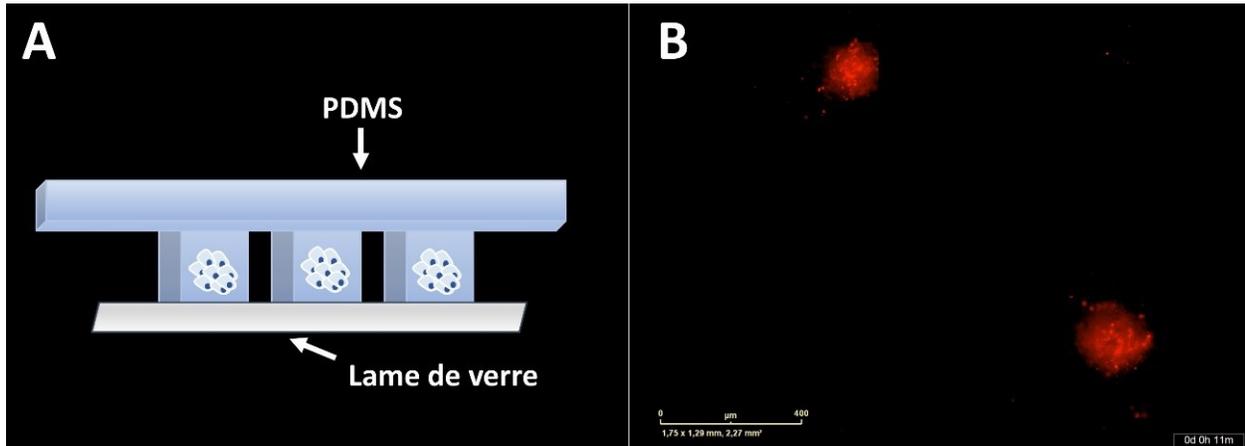


Figure 22. – Images en fluorescence de sphéroïdes STS117 formés dans le système microfluidique avec un fond de verre (A) et marqués avec du DRAQ5 (B, marqueur de vie).

5.3 – Augmenter le réalisme du modèle tout en gardant sa simplicité : trouver le bon compromis

Les sphéroïdes utilisés dans cette étude sont issus de lignées cellulaires et cultivés en suspension. Ils sont un modèle simple. Leur pertinence physiologique pourrait être augmentée. Augmenter le réalisme du modèle cellulaire utilisé permettrait de prédire le plus efficacement possible la réponse aux traitements *in vivo*. Il y a plusieurs façons d'augmenter le réalisme de notre modèle.

Tout d'abord, la taille des sphéroïdes utilisés pourrait être augmentée. Les sphéroïdes avec un diamètre > 500 µm développent des gradients chimiques plus importants résultants en un cœur nécrotique due notamment à l'hypoxie⁸¹. Cette propriété est présente dans les tumeurs avasculaires et les micro-métastases et à un rôle important dans l'émergence de résistance au traitement par radiation. Différentes couches de prolifération se développent dans ces modèles, avec de la surface au cœur du sphéroïde : des cellules hautement prolifératives, des cellules au repos et des cellules nécrotiques. Cependant, comme évoqué précédemment, un grand nombre

de cellules serait nécessaire pour former de tels sphéroïdes. Ceci à un impact sur le coût, comme il faudrait une utilisation extensive de cellules et de matériel de culture, mais aussi sur l'intensité du travail requis. Les tests de survie clonogénique requièrent un grand nombre de sphéroïdes, la culture de ces larges sphéroïdes n'est donc pas adaptée pour ce type d'analyse. Cependant, ce type de modèle serait adapté à un criblage utilisant l'imagerie en continu (Incucyte). En effet, quelques sphéroïdes seulement seraient nécessaires par condition pour ce type d'analyse.

L'utilisation de cellules issues de biopsies de patients permettrait d'augmenter le réalisme de notre modèle. Les sphéroïdes utilisés dans notre étude sont des sphéroïdes issus de lignées cellulaires. Comme vu précédemment, les lignées cellulaires perdent des propriétés importantes des tumeurs dont elles sont issues au cours des passages. L'utilisation de cellules issues directement de biopsies de patients (culture organotypique de cellules primaires) est une alternative permettant d'augmenter la précision du modèle. En effet, ces cultures conservent certaines des propriétés importantes des tumeurs *in situ* notamment des éléments tissulaires comme : la matrice extracellulaire, les capillaires et les cellules immunitaires, qui récapitulent bien l'hétérogénéité tumorale¹⁴⁹. Une étude a démontré que les sphéroïdes issus de biopsies préservent aussi leur potentiel initiateur de tumeur¹⁵⁰. Cependant le passage *ex vivo* peut générer un stress important qui altère le transcriptome des cellules. Un désavantage technique des cultures primaires est qu'elles prolifèrent lentement et ont un nombre de passages limité avant d'entrer en senescence. Ainsi, il est parfois difficile d'obtenir une grande quantité de cellules issues de ces cultures pour former des sphéroïdes. De plus, les échantillons de biopsies peuvent contenir des cellules épithéliales non-cancéreuses qui sont difficiles à distinguer et séparer des cellules cancéreuses souhaitées¹⁵¹.

Malgré les défis associés avec l'utilisation de cellules primaires, ce type de culture cellulaire ouvrirait la porte à un nouveau type de criblage pouvant être exploité utilisant notre système et méthodologie : le criblage de combinaisons d'immunothérapie avec la radiothérapie. En effet il a été démontré que les sphéroïdes issus de biopsies de patients conservent des cellules immunitaires et répondent au blocage par les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire PD-1¹⁵².

Chapitre 6 – Conclusion

Cette étude propose une nouvelle approche pour la découverte d'agents radiosensibilisants et radioprotecteurs. En adoptant une stratégie de repositionnement, cette approche permettrait de réduire les coûts et le temps de développement de nouveaux composés. Elle vise aussi à promouvoir l'utilisation de sphéroïdes comme modèle préclinique pour déterminer l'efficacité des traitements combinatoire. Contrairement aux cultures cellulaires 2D majoritairement utilisées, les sphéroïdes récapitulent des propriétés importantes des tumeurs *in vivo* comme l'hypoxie et les gradients de prolifération. Ces propriétés sont clés pour analyser la réponse au traitement. L'utilisation d'un modèle préclinique *in vitro* plus prédictif permettrait de contribuer à diminuer le grand taux d'échec des traitements en phase clinique. En éliminant les composés dont l'efficacité thérapeutique est faible, il permettra de réduire le nombre de composés qui poursuivront avec les études *in vivo*, réduisant ainsi l'expérimentation animale.

Un système microfluidique a été développé permettant la formation de 336 sphéroïdes homogènes en l'espace de deux jours, avec intervention minimale de l'utilisateur. Ceci est une amélioration conséquente par rapport aux méthodes les plus couramment utilisées (gouttelettes suspendues, flottement forcé). Les sphéroïdes sont formés dans des chambres de cultures isolées les unes des autres grâce à un système de valve magnétique afin d'éviter des effets *bystander*. La technique d'irradiation, utilisant un appareil d'orthovoltage, permet d'irradier chaque système avec 4 doses de radiothérapie différentes, augmentant le débit expérimental.

L'approche complète est la suivante : Un agent thérapeutique d'intérêt est choisi, par exemple en utilisant les informations contenues dans des bibliothèques de données. Les sphéroïdes de cellules cancéreuses sont formés dans le système microfluidique, puis traités avec l'agent thérapeutique d'intérêt. Ils sont ensuite exposés à 4 doses de RT en utilisant la technique de modulation de la dose. L'analyse de la réponse au traitement est effectuée par test de survie clonogénique, pour l'analyse de la mort des cellules à la suite d'un traitement par radiation. Les modèles de Chou-Talalay et DMR permettent de quantifier la synergie entre l'agent thérapeutique et la RT.

Cette méthodologie permettrait ultimement d'accélérer la découverte de nouveaux agents radiosensibilisants et radioprotecteurs.

Références bibliographiques

1. Smith, L. *et al.* Members of the Canadian Cancer Statistics Advisory Committee Project management. (2018).
2. *Canadian Cancer Statistics 2015 Special topic: Predictions of the future burden of cancer in Canada.*
3. Chen, H. H. W. & Kuo, M. T. Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.18409
4. Teng, F., Kong, L., Meng, X., Yang, J. & Yu, J. Radiotherapy combined with immune checkpoint blockade immunotherapy: Achievements and challenges. *Cancer Letters* (2015). doi:10.1016/j.canlet.2015.05.012
5. Wang, H., Mu, X., He, H. & Zhang, X. D. Cancer Radiosensitizers. *Trends in Pharmacological Sciences* (2018). doi:10.1016/j.tips.2017.11.003
6. Wang, H., Mu, X., He, H. & Zhang, X. D. Cancer Radiosensitizers. *Trends Pharmacol. Sci.* **39**, 24–48 (2018).
7. Lin, S. H. *et al.* Opportunities and challenges in the era of molecularly targeted agents and radiation therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 686–693 (2013).
8. Clinical testing of the radiosensitizer ro 07-0582: Experience with multiple doses. *Br. J. Cancer* **35**, 567–579 (1977).
9. Hutchison, S. *et al.* Evaluation of Melanin-Targeted Radiotherapy in Combination with Radiosensitizing Drugs for the Treatment of Melanoma. *Cancer Oncol. Res.* **2**, 58–67 (2014).
10. Wong, P. *et al.* Combining targeted agents with modern radiotherapy in soft tissue sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **106**, 16–18 (2014).
11. Bonner, J. A. *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol.* **11**, 21–28 (2010).

12. Scannell, J. W., Blanckley, A., Boldon, H. & Warrington, B. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nature Reviews Drug Discovery* (2012). doi:10.1038/nrd3681
13. Hait, W. N. Anticancer drug development: The grand challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 253–254 (2010).
14. Weir, S. J., DeGennaro, L. J. & Austin, C. P. Repurposing approved and abandoned drugs for the treatment and prevention of cancer through public-private partnership. *Cancer Research* (2012). doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3439
15. Pushpakom, S. *et al.* Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery* (2018). doi:10.1038/nrd.2018.168
16. Mullard, A. Could pharma open its drug freezers? *Nat. Rev. Drug Discov.* (2011). doi:10.1038/nrd3473
17. Bertolini, F., Sukhatme, V. P. & Bouche, G. Drug repurposing in oncology-patient and health systems opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology* (2015). doi:10.1038/nrclinonc.2015.169
18. Ashburn, T. T. & Thor, K. B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 673–683 (2004).
19. Hutchinson, L. & Kirk, R. High drug attrition rates - Where are we going wrong? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 189–190 (2011).
20. Caponigro, G. & Sellers, W. R. Advances in the preclinical testing of cancer therapeutic hypotheses. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 179–187 (2011).
21. Kola, I. & Landis, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 711–716 (2004).
22. LaBarbera, D. V, Reid, B. G. & Yoo, B. H. The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **7**, 819–830 (2012).

23. Hirschhaeuser, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **148**, 3–15 (2010).
24. Lin, R. Z. & Chang, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal* (2008). doi:10.1002/biot.200700228
25. Benien, P. & Swami, A. 3D tumor models: History, advances and future perspectives. *Futur. Oncol.* **10**, 1311–1327 (2014).
26. Kwapiszewska, K., Michalczuk, A., Rybka, M., Kwapiszewski, R. & Brzózka, Z. A microfluidic-based platform for tumour spheroid culture, monitoring and drug screening. *Lab Chip* **14**, 2096–2104 (2014).
27. Mulholland, T. *et al.* Drug screening of biopsy-derived spheroids using a self-generated microfluidic concentration gradient. *Sci. Rep.* **8**, 1–12 (2018).
28. Patra, B., Peng, C. C., Liao, W. H., Lee, C. H. & Tung, Y. C. Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
29. Patra, B. *et al.* A microfluidic device for uniform-sized cell spheroids formation, culture, harvesting and flow cytometry analysis. *Biomicrofluidics* **7**, 1–11 (2013).
30. Duinkerken, C. W. *et al.* Orthovoltage for basal cell carcinoma of the head and neck: Excellent local control and low toxicity profile. *Laryngoscope* **126**, 1796–1802 (2016).
31. Krema, H. *et al.* Orthovoltage radiotherapy in the management of medial canthal basal cell carcinoma. *Br. J. Ophthalmol.* **97**, 730–734 (2013).
32. Ramachandran, S., lent, J., Göttgen, E. L., Krieg, A. J. & Hammond, E. M. Epigenetic therapy for solid tumors: Highlighting the impact of tumor hypoxia. *Genes (Basel)*. **6**, 935–956 (2015).
33. Trédan, O., Galmarini, C. M., Patel, K. & Tannock, I. F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1441–1454 (2007).

34. Teicher, B. A. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* **13**, 139–168 (1994).
35. Shannon, A. M., Bouchier-Hayes, D. J., Condrón, C. M. & Toomey, D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat. Rev.* **29**, 297–307 (2003).
36. Kyle, A. H., Baker, J. H. E. & Minchinton, A. I. Targeting quiescent tumor cells via oxygen and IGF-I supplementation. *Cancer Res.* **72**, 801–809 (2012).
37. Fitzgerald, K. A., Malhotra, M., Curtin, C. M., O’Brien, F. J. & O’Driscoll, C. M. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *J. Control. Release* **215**, 39–54 (2015).
38. Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C. & De Boer, J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology* (2013). doi:10.1016/j.tibtech.2012.12.003
39. Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S. & Searson, P. C. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **4**, (2016).
40. Clejan, S., O’Connor, K. & Rosensweig, N. Tri-dimensional prostate cell cultures in simulated microgravity and induced changes in lipid second messengers and signal transduction. *J. Cell. Mol. Med.* **5**, 60–73 (2001).
41. Mayer, B. *et al.* Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. *Gastroenterology* **121**, 839–852 (2001).
42. Hofstaedter, F. & Ebner, R. The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening : **9**, 273–285 (2004).
43. Breslin, S. & O’Driscoll, L. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today* (2013). doi:10.1016/j.drudis.2012.10.003
44. Lazzari, G., Couvreur, P. & Mura, S. Multicellular tumor spheroids: A relevant 3D model for the: In vitro preclinical investigation of polymer nanomedicines. *Polym. Chem.* **8**, 4947–

- 4969 (2017).
45. Dubessy, C., Merlin, J. L., Marchal, C. & Guillemin, F. Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **36**, 179–192 (2000).
 46. Rohwer, N. & Cramer, T. Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist. Updat.* **14**, 191–201 (2011).
 47. Friedrich, J. *et al.* A reliable tool to determine cell viability in complex 3-D culture: The acid phosphatase assay. *J. Biomol. Screen.* **12**, 925–937 (2007).
 48. Humpel, C. Neuroscience forefront review organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience* **305**, 86–98 (2015).
 49. Chang, T. C. *et al.* Parallel microfluidic chemosensitivity testing on individual slice cultures. *Lab Chip* **14**, 4540–4551 (2014).
 50. van der Kuip, H. *et al.* Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer* **6**, 1–11 (2006).
 51. 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).
 52. 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).
 53. Kondo, J. & Inoue, M. Application of Cancer Organoid Model for Drug Screening and Personalized Therapy. *Cells* **8**, 470 (2019).
 54. Drost, J. & Clevers, H. Organoids in cancer research. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 407–418 (2018).
 55. Langhans, S. A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–14 (2018).
 56. Härmä, V. *et al.* A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate

- cancer growth, invasion and drug responses. *PLoS One* **5**, (2010).
57. Yip, D. & Cho, C. H. A multicellular 3D heterospheroid model of liver tumor and stromal cells in collagen gel for anti-cancer drug testing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **433**, 327–332 (2013).
 58. Caliari, S. R. & Burdick, J. A. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat. Methods* **13**, 405–414 (2016).
 59. Werbowetski, T., Bjerkvig, R. & Del Maestro, R. F. Evidence for a secreted chemorepellent that directs glioma cell invasion. *J. Neurobiol.* **60**, 71–88 (2004).
 60. Nath, S. & Devi, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol. Ther.* **163**, 94–108 (2016).
 61. Dittrich, P. S. & Manz, A. Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 210–218 (2006).
 62. Ríos, Á., Zougagh, M. & Avila, M. Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review. *Anal. Chim. Acta* **740**, 1–11 (2012).
 63. Zio, K. Microfluidic devices as tools for mimicking the in vivo environment. 979–990 (2012). doi:10.1039/c0nj00709a
 64. Whitesides, G. M., Ostuni, E., Jiang, X. & Ingber, D. E. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **3**, 335–73 (2001).
 65. Faustino, V., Catarino, S. O., Lima, R. & Minas, G. Biomedical microfluidic devices by using low-cost fabrication techniques: A review. *J. Biomech.* **49**, 2280–2292 (2016).
 66. Stelmachowska, A., Kwapiszewski, R., Chudy, M. & Dybko, A. Long-term three-dimensional cell culture and anticancer drug activity evaluation in a microfluidic chip. *Biosens. Bioelectron.* **40**, 68–74 (2013).
 67. Yu, L., Chen, M. C. W. & Cheung, K. C. Droplet-based microfluidic system for multicellular tumor spheroid formation and anticancer drug testing. *Lab Chip* 2424–2432 (2010).

doi:10.1039/c004590j

68. Torisawa, Y. *et al.* A multicellular spheroid array to realize spheroid formation , culture , and viability assay on a chip. *Biomaterials* **28**, 559–566 (2007).
69. Jin, Hye-Jin, Young-Ho Cho, Jin-Mo Gu, Jhngook Kim, and Y.-S. O. A multicellular spheroid formation and extraction chip using removable. *Lab Chip* 115–119 (2011). doi:10.1039/c0lc00134a
70. Fu, C., Tseng, S., Yang, S. & Hsu, L. A microfluidic chip with a U-shaped microstructure array for multicellular spheroid formation , culturing and analysis. *Biofabrication* (2014). doi:10.1088/1758-5082/6/1/015009
71. Ruppen, J. *et al.* A microfluidic platform for chemoresistive testing of multicellular pleural cancer spheroids. *Lab Chip* **14**, 1198–1205 (2014).
72. 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).
73. Brunet, A. R., Labelle, F., Wong, P. & Gervais, T. Reconfigurable microfluidic magnetic valve arrays: Towards a radiotherapy-compatible spheroid culture platform for the combinatorial screening of cancer therapies. *Sensors (Switzerland)* **17**, (2017).
74. Patra, B., Peng, C. C., Liao, W. H., Lee, C. H. & Tung, Y. C. Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device. *Sci. Rep.* (2016). doi:10.1038/srep21061
75. Wang, Y. *et al.* Spheroid formation of hepatocarcinoma cells in microwells: Experiments and Monte Carlo simulations. *PLoS One* **11**, 1–13 (2016).
76. Cui, X., Hartanto, Y. & Zhang, H. Advances in multicellular spheroids formation. *J. R. Soc. Interface* **14**, (2017).
77. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. & Kunz-schughart, L. A. Spheroid-based drug screen : considerations and practical approach. **4**, (2009).

78. Ducommun, B. *et al.* Abstract 4404: Multicellular tumor spheroid models to evaluate drugs targeting cell cycle checkpoints in 3D. 4404–4404 (2013). doi:10.1158/1538-7445.am2013-4404
79. Grimes, D. R., Kelly, C., Bloch, K. & Partridge, M. A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids. *J. R. Soc. Interface* **11**, (2014).
80. Hardelauf, H. *et al.* Microarrays for the scalable production of metabolically relevant tumour spheroids: A tool for modulating chemosensitivity traits. *Lab Chip* **11**, 419–428 (2011).
81. Riffle, S., Pandey, R. N., Albert, M. & Hegde, R. S. Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer* **17**, (2017).
82. Sutherland, R. M. The multicellular spheroid system as a tumor model for studies of radiation sensitizers. *Pharmacol. Ther.* **8**, 105–123 (1980).
83. Durand, R. E. & Sutherland, R. M. Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. *Exp. Cell Res.* **71**, 75–80 (1972).
84. Nakajima, A. *et al.* Radiation sensitivity assay with a panel of patient-derived spheroids of small cell carcinoma of the cervix. *Int. J. Cancer* **136**, 2949–2960 (2015).
85. Al-Ramadan, A., Mortensen, A. C., Carlsson, J. & Nestor, M. V. Analysis of radiation effects in two irradiated tumor spheroid models. *Oncol. Lett.* **15**, 3008–3016 (2018).
86. Hinz, G. & Dertinger, H. Increased radioresistance of cells in cultured multicell spheroids. *Radiat. Environ. Biophys.* **21**, 255–264 (1983).
87. Olive, P. L., Oloumi, A., Lam, W. & Bana, J. P. Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. *Int. J. Radiat. Biol.* **78**, (2002).
88. Khaitan, D., Chandna, S., Arya, M. B. & Dwarakanath, B. S. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; implications for tumor therapy. *J. Transl. Med.* **4**, 1–13 (2006).

89. Lesueur, P. *et al.* Poly-(ADP-ribose)-polymerase inhibitors as radiosensitizers: a systematic review of pre-clinical and clinical human studies. *Oncotarget* **8**, 69105–69124 (2017).
90. Soni, A. *et al.* Inhibition of Parp1 by BMN673 Effectively Sensitizes Cells to Radiotherapy by Upsetting the Balance of Repair Pathways Processing DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 2206–2216 (2018).
91. Lee, H.-J. *et al.* Combining PARP-1 Inhibition and Radiation in Ewing Sarcoma Results in Lethal DNA Damage. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 2591–2600 (2013).
92. Laird, J. H. *et al.* Talazoparib is a potent radiosensitizer in small cell lung cancer cell lines and xenografts. *Clin. Cancer Res.* **24**, 5143–5152 (2018).
93. Goel, A. & Aggarwal, B. B. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutr. Cancer* **62**, 919–930 (2010).
94. Karthikeyan, S., Kanimozhi, G., Prasad, N. R. & Mahalakshmi, R. Radiosensitizing effect of ferulic acid on human cervical carcinoma cells in vitro. *Toxicol. Vitr.* **25**, 1366–1375 (2011).
95. Chen, S., Wang, H., Ng, W. L., Curran, W. J. & Wang, Y. Radiosensitizing effects of ectopic miR-101 on non-small-cell lung cancer cells depend on the endogenous miR-101 level. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **81**, 1524–1529 (2011).
96. Olive, P. L. & Durand, R. E. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.* **13**, 121–138 (1994).
97. Griffon-etienne, G., Merlina, J. & Marchal, C. In vitro evaluation of Taxol combined with radiations in human squamous cell carcinoma spheroids. *Cancer Lett.* **109**, 23–32 (1996).
98. Stingl, L. *et al.* Novel HSP90 inhibitors, NVP-AUY922 and NVP-BEP800, radiosensitize tumour cells through cell-cycle impairment, increased DNA damage and repair protraction. *Br. J. Cancer* **102**, 1578–1591 (2010).
99. Eshleman, J. S. *et al.* Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 xenografts to fractionated radiation therapy. *Cancer Res.* **62**, 7291–7297 (2002).

100. Pires, I. M. *et al.* Targeting radiation-resistant hypoxic tumour cells through ATR inhibition. *Br. J. Cancer* **107**, 291–299 (2012).
101. Tung, Y. C. *et al.* High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* (2011). doi:10.1039/c0an00609b
102. Méry, B. *et al.* In vitro cell death determination for drug discovery: A landscape review of real issues. *J. Cell Death* **10**, (2017).
103. Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* **1**, 2315–9 (2006).
104. Seymour, C. B. & Mothersill, C. Radiation-induced bystander effects — implications for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 158–164 (2011).
105. Azzam, E. I., De Toledo, S. M. & Little, J. B. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene* **22**, 7050–7057 (2003).
106. He, M. *et al.* Cytochrome-c mediated a bystander response dependent on inducible nitric oxide synthase in irradiated hepatoma cells. *Br. J. Cancer* **106**, 889–895 (2012).
107. Asghar, W. *et al.* Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. *Mater. Today* **18**, 539–553 (2015).
108. Aijian, A. P. & Garrell, R. L. Digital Microfluidics for Automated Hanging Drop Cell Spheroid Culture. *J. Lab. Autom.* **20**, 283–295 (2015).
109. Trietsch, S. J., Israëls, G. D., Joore, J., Hankemeier, T. & Vulto, P. Microfluidic titer plate for stratified 3D cell culture. *Lab Chip* **13**, 3548–3554 (2013).
110. Li, X. *et al.* Micro-scaffold array chip for upgrading cell-based high-throughput drug testing to 3D using benchtop equipment. *Lab Chip* **14**, 471–481 (2014).
111. Chen, Y., Gao, D., Liu, H., Lin, S. & Jiang, Y. Drug cytotoxicity and signaling pathway analysis with three-dimensional tumor spheroids in a microwell-based microfluidic chip for drug screening. *Anal. Chim. Acta* **898**, 85–92 (2015).

112. Yi, S. H. *et al.* High-Throughput Screening (HTS) of Anticancer Drug Efficacy on a Micropillar/Microwell Chip Platform. *Anal. Chem.* **86**, 535–542 (2013).
113. Das, T. *et al.* Empirical chemosensitivity testing in a spheroid model of ovarian cancer using a microfluidics-based multiplex platform. *Biomicrofluidics* **7**, 1–15 (2013).
114. Frimat, J. P. *et al.* The network formation assay: A spatially standardized neurite outgrowth analytical display for neurotoxicity screening. *Lab Chip* **10**, 701–709 (2010).
115. Wang, W. *et al.* 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **30**, 2705–2715 (2009).
116. Gunderson, L. L. & Tepper, J. E. *Clinical radiation oncology - Third Edition.* (Elsevier Health Sciences, 2012).
117. Collins, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology* **26**, 249–261 (2004).
118. Olive, P. L. & Banáth, J. P. The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* **1**, 23–29 (2006).
119. Mangoni, M. *et al.* Soft tissue sarcomas: new opportunity of treatment with PARP inhibitors? *Radiol. Medica* **124**, 1–8 (2018).
120. Tian, J. *et al.* Radioprotection and cell cycle arrest of intestinal epithelial cells by darinaparsin, a tumor radiosensitizer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **87**, 1179–1185 (2013).
121. Strittmatter, S. M. Overcoming Drug Development Bottlenecks With Repurposing: Old drugs learn new tricks. *Nat. Med.* (2014). doi:10.1038/nm.3595
122. Ruppen, J. *et al.* A microfluidic platform for chemoresistive testing of multicellular pleural cancer spheroids. *Lab Chip* (2014). doi:10.1039/c3lc51093j

123. Marimuthu, M. *et al.* Multi-size spheroid formation using microfluidic funnels. *Lab Chip* **18**, 304–314 (2018).
124. Rousset, N., Monet, F. & Gervais, T. Simulation-assisted design of microfluidic sample traps for optimal trapping and culture of non-adherent single cells, tissues, and spheroids. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
125. Wong, P. *et al.* Prognostic microRNAs modulate the RHO adhesion pathway: A potential therapeutic target in undifferentiated pleomorphic sarcomas. *Oncotarget* **6**, 39127–39139 (2015).
126. Ma, C. M. *et al.* AAPM protocol for 40–300 kV x-ray beam dosimetry in radiotherapy and radiobiology. *Med. Phys.* **28**, 868–893 (2001).
127. Mayer, R. R. *et al.* Enhanced dosimetry procedures and assessment for EBT2 radiochromic film. *Med. Phys.* **39**, 2147–2155 (2012).
128. Kamio, Y. *et al.* Validation of an orthovoltage based high-throughput microfluidic lab-on-a-chip radiobiological platform using EBT3 Gafchromic™ film multichannel dosimetry. in (The Canadian Organization of Medical Physics (COMP) Annual meeting (In press), 2019).
129. Chou, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the choutalalay method. *Cancer Research* (2010). doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947
130. Subiel, A., Ashmore, R. & Schettino, G. Standards and methodologies for characterizing radiobiological impact of high-Z nanoparticles. *Theranostics* **6**, 1651–1671 (2016).
131. Moneef, M. A. L. *et al.* Measurements using the alkaline comet assay predict bladder cancer cell radiosensitivity. *Br. J. Cancer* **89**, 2271–2276 (2003).
132. Unkel, S., Belka, C. & Lauber, K. On the analysis of clonogenic survival data: Statistical alternatives to the linear-quadratic model. *Radiat. Oncol.* **11**, 1–11 (2016).
133. Schilling, D., Garrido, C., Combs, S. E. & Multhoff, G. The Hsp70 inhibiting peptide aptamer A17 potentiates radiosensitization of tumor cells by Hsp90 inhibition. *Cancer Lett.* **390**, 146–152 (2017).

134. Watanabe, R., Rahmanian, S. & Nikjoo, H. Spectrum of Radiation-Induced Clustered Non-DSB Damage – A Monte Carlo Track Structure Modeling and Calculations. *Radiat. Res.* **183**, 525–540 (2015).
135. Das, P. *et al.* High prevalence of p53 exon 4 mutations in soft tissue sarcoma. *Cancer* **109**, 2323–2333 (2007).
136. Menon, V. & Povirk, L. Involvement of p53 in the repair of DNA double strand breaks: multifaceted Roles of p53 in homologous recombination repair (HRR) and non-homologous end joining (NHEJ). in *Mutant p53 and MDM2 in cancer* 321–326 (Springer, 2014).
137. Bourhis, J. *et al.* Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet* **368**, 843–854 (2006).
138. de Bono, J. *et al.* Phase I, dose-escalation, two-part trial of the PARP inhibitor talazoparib in patients with advanced germline BRCA1/2 mutations and selected sporadic cancers. *Cancer Discov.* **7**, 620–629 (2017).
139. Khaitan, D., Chandna, S., Arya, M. B. & Dwarakanath, B. S. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; implications for tumor therapy. *J. Transl. Med.* **4**, 1–13 (2006).
140. Lakomy, D. S., Urbauer, D. L., Westin, S. N. & Lin, L. Phase I Study of the PARP inhibitor talazoparib with radiation therapy for locally recurrent gynecologic cancers. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* (2019). doi:10.1016/j.ctro.2019.12.005
141. Ben-David, U. *et al.* Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature* **560**, 325–330 (2018).
142. Hall, E. J. & Giaccia, A. *Radiobiology for the Radiologist*. (Lippincott Williams and Wilkins, 2006).
143. Wong, P. *et al.* Combining targeted agents with modern radiotherapy in soft tissue sarcomas. *Journal of the National Cancer Institute* (2014). doi:10.1093/jnci/dju329
144. Murai, J. *et al.* Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res.* **72**,

- 5588–5599 (2012).
145. Bristow, R. G. *et al.* Combining precision radiotherapy with molecular targeting and immunomodulatory agents: a guideline by the American Society for Radiation Oncology. *Lancet Oncol.* **19**, e240–e251 (2018).
 146. Wang, Y. *et al.* Combining immunotherapy and radiotherapy for cancer treatment: Current challenges and future directions. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–11 (2018).
 147. Smirnov, P. *et al.* PharmacoDB: An integrative database for mining in vitro anticancer drug screening studies. *Nucleic Acids Res.* **46**, D994–D1002 (2018).
 148. Yang, W. *et al.* Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): A resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **41**, 955–961 (2013).
 149. Rajcevic, U. *et al.* Colorectal cancer derived organotypic spheroids maintain essential tissue characteristics but adapt their metabolism in culture. *Proteome Sci.* **12**, 1–14 (2014).
 150. Sakariassen, P. *et al.* Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16466–16471 (2006).
 151. Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. J. & Speirs, V. Breast cancer cell lines: Friend or foe? *Breast Cancer Res.* **5**, 89–95 (2003).
 152. Aref, A. R. *et al.* 3D microfluidic: Ex vivo culture of organotypic tumor spheroids to model immune checkpoint blockade. *Lab Chip* **18**, 3129–3143 (2018).