

L'Institut Agro Rennes-Angers

Site d'Angers Site de Rennes

<p>Année universitaire : 2022-2023</p> <p>Spécialité : Sciences Halieutiques et Aquacoles</p> <p>Spécialisation (et option éventuelle) : Aquaculture</p>	<p>Mémoire de fin d'études</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> d'ingénieur de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)</p> <p><input type="checkbox"/> de master de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)</p> <p><input type="checkbox"/> de l'Institut Agro Montpellier (étudiant arrivé en M2)</p> <p><input type="checkbox"/> d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)</p>
--	--

Développement et validation de l'utilisation de puces microfluidiques pour l'irradiation d'embryons de poissons et de *C.elegans* pour évaluer des dommages à l'ADN

Par : Sarah ELIE



Soutenu à Rennes le 13 septembre 2023

Devant le jury composé de :

Président : Bastien Sadoul

Maître de stage : Christelle Adam-Guillermin

Enseignant référent : Bastien Sadoul

Autres membres du jury (Nom, Qualité)

Hervé Le Bris, Enseignant-chercheur

Julien Bobe, Directeur de recherche

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle de l'Institut Agro Rennes-Angers

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation « Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France » disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>




Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Confidentialité

Non Oui si oui : 1 an 5 ans 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible ⁽¹⁾.

Date et signature du **maître de stage** ⁽²⁾ : 13/9/23 
(ou de l'étudiant-entrepreneur)

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

Droits d'auteur

L'auteur ⁽³⁾ Nom Prénom Elie Sarah

autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non


Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement ⁽⁴⁾

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

(Facultatif) accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-By-Nc-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

Date et signature de l'**auteur** : 13/09/2023


Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non


Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement ⁽⁴⁾

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'**enseignant** : 

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation de l'Institut Agro Rennes-Angers s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3) Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Christelle Adam-Guillermin pour sa confiance, son soutien indéfectible, sa bonne humeur, et sa disponibilité.

Je remercie aussi Bastien Sadoul, mon enseignant référent à l'Institut Agro, pour son suivi et ses recommandations.

Je veux aussi remercier Ahmad Sleiman, thésard en troisième année au LMDN, pour m'avoir autant appris sur ses nématodes, et m'avoir soutenu tout du long de ce stage.

Je remercie aussi Rémi Courson, ingénieur de recherche en microfluidique à l'Ifremer, pour toutes les puces, tous les mails imagés, et toutes les modifications apportées à ces puces. Je remercie Cyrille Przybyla, Gilbert Dutto, et Emmanuel Mansuy, de l'Ifremer de Palavas-le-Flots, pour les réunions sur la puce et leur accueil lors de ma visite.

De plus, je remercie l'équipe du LECO chez qui je suis souvent allée m'incruster, et qui m'accueillera en octobre pour ma thèse. Tout particulièrement Isabelle et Virginie pour leur aide sur des manipulations.

Merci aussi à toute l'équipe du LMDN, à Sandrine et nos pauses thé, aux autres stagiaires Steven et Louis pour les pauses pâtisseries, et tous les autres.

Table des matières

Introduction	1
1. Contexte global.....	4
1.1. Présentation de l'IRSN.....	4
1.2. LMDN	4
1.3. MIRCOM.....	4
1.4. Puces microfluidiques	5
2. La puce microfluidique pour l'irradiation des poissons	6
2.1. Contexte.....	6
2.1.1. Les projets European Moon Village, Lunar Hatch, et Corafe	6
2.1.2. Espèce modèle : le Danio rerio	6
2.2. Matériel et méthode	7
2.2.1. Maintenance du poisson zèbre.....	7
2.2.2. Conditions d'irradiation	8
2.2.3. Création de la puce microfluidique.....	9
2.2.4. Évaluation des dommages	10
2.3. Résultats.....	11
2.3.1. Développement de la puce microfluidique.....	11
2.3.2. Données des irradiations précédentes sur embryons de bars.....	15
2.3.3. Évaluation des dommages chez les embryons testés avec la puce	17
2.4. Discussion/Conclusion partielle.....	19
3. La puce microfluidique pour l'irradiation des nématodes.....	20
3.1. Contexte.....	20
3.1.1. Thèse de Ahmad Sleiman.....	20
3.1.2. Espèce modèle : Caenorhabditis elegans.....	20
3.2. Matériel et méthode	22
3.2.1. Maintenance	22
3.2.2. Conditions d'irradiations.....	22
3.2.3. Puce microfluidique pour l'irradiation de C. elegans.....	23
3.2.4. Évaluation des dommages	25
3.3. Résultats.....	26
3.3.1. Développement de la puce	26

3.3.2. Évaluation des dommages	28
3.4. Discussion/Conclusion partielle.....	29
4. Conclusion globale.....	30
Bibliographie	31
Annexes.....	35

Liste des abréviations

AMANDE : Accélérateur pour la Métrologie et les Applications Neutroniques en Dosimétrie Externe

AMTI : Aquaculture Multi-Trophique Intégrée

CAO : Conception Assistée par Ordinateur

CENBG : Centre d'Études Nucléaires de Bordeaux-Gradignan

Corafe : Cosmic Ray on Fish Embryos

ESA : European Space Agency

Hpf : heures post fécondation

IF : ImmunoFluorescence

Ifremer : Institut Français pour l'Exploitation de la Mer

IRSN : Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

LECO : Laboratoire de recherche sur les effets des radionucléides sur les ECOsystèmes

LMDN : Laboratoire de Micro-irradiation, de métrologie et de Dosimétrie des Neutrons

MIRCOM : Microfaisceaux d'Ions dédiées à la Radiobiologie à l'échelle de la Cellule et des Organismes Multicellulaire

NGM : Nematode Growth Media (Milieu de culture pour nématodes)

PDMS : PolyDiMethylSiloxane

PP : PolyPropylène

qPCR : Réaction de Polymérase en Chaîne quantitative

TI : Tail Intensity

TM : Tail Moment

UMR : Unité Mixte de Recherche

Liste des annexes

<i>Annexe I : Protocole du test comète sur poisson zèbre</i>	<i>35</i>
<i>Annexe II : Tableaux des résultats des tests comètes des irradiations d'embryons de bars des irradiations de mars et octobre 2022, dans le cadre du projet Corafe</i>	<i>36</i>
<i>Annexe III : Protocole d'isolement cellulaire C. elegans (Wormbook, Imanikia et al., 2016)...</i>	<i>37</i>

Liste des illustrations

Figure 1 : Plan de la plateforme d'irradiation Amande-Mircom	4
Figure 2 : Dispositif d'irradiation des embryons de bars sur la plateforme AMANDE pour les manipulations de mars et octobre 2022. Les œufs sont placés dans un aquarium tempéré et oxygéné avec plusieurs compartiments, et l'aquarium est aligné avec le bout de ligne du faisceau. (Przybyla et al., 2022)	8
Figure 3 : Photo de l'installation pour les tests de la puce microfluidique pour embryons de poissons avec le système de bain-marie (à gauche), la pompe péristaltique (au centre), le bout de ligne de MIRCOM (à droite).	9
Figure 4 : Cellules sans dommage à l'ADN (à gauche), et cellules avec des dommages à l'ADN appelées comètes (à droite) (Bright, 2011)	10
Figure 5 : Première puce microfluidique pour embryons de poissons testées, avec 1) la CAO (Conception Assistée par Ordinateur), 2) la puce, et 3) la puce vue sous loupe binoculaire avec des embryons.	12
Figure 6 : Photos de la seconde puce microfluidique avec 1) la CAO, 2) la puce sur la platine motorisée sur MIRCOM, et 3) la puce avec des œufs vue sous loupe binoculaire	13
Figure 7 : Photo de l'écran de l'ordinateur connecté au microscope sur MIRCOM permettant de viser les embryons pour l'irradiation (à gauche), la croix rouge est supposée être sur un embryon, et photo du même écran avec un picot causé par l'impression 3D de la puce (à droite).	14
Figure 8 : 1) CAO du troisième modèle de la puce microfluidique pour embryons de poissons, 2) le plot dans le canal est clairement visible.	14
Figure 9 : Graphiques de la comparaison des moyennes des log des Tail Moment des comètes par lame, pour les expositions de mars 2022 au bout de un jour d'irradiation (h24 à gauche) (4,7mSv) et de deux jours d'irradiation (h48 à droite)(11,7mSv).	16
Figure 10 : Graphique de la comparaison des moyennes des log des Tail Moment des comètes par lame, pour les expositions d'octobre 2022 au bout de un jour d'irradiation (h24 à gauche) (138mSv) et de trois jours d'irradiation (h72 à droite) (314mSv).	17
Figure 11 : Graphiques du log des valeurs de Tail Moment (TM) en fonction du traitement (Control et Puce) pour des embryons à 6hpf (à gauche) et 20 hpf (à droite).	17
Figure 12 : Graphique de la distribution des valeurs de BPM des deux lots de poissons zèbre, le lot 1 à 6 hpf et le lot 2 à 20 hpf	18
Figure 13 : Cycle de vie de <i>C. elegans</i> et stades de développements. (a) Schéma du cycle de vie de l'embryon, en passant par les 4 stades larvaires de L1 à L4 jusqu'à l'adulte fertile. Un cycle est complété en 2,5 jours sous 20°C avec OP50 sur boîte NGM. Les adultes pondent 300 œufs qui éclosent sous 9 heures avec un développement ex-utéro. (b) Image montrant un mélange de plusieurs stades de développement sur une boîte gélosée. La barre de mesure fait 100µm. (Rieckher et al., 2017)	21
Figure 14 : Préparation des échantillons pour l'irradiation. (A) Dish avec némtodes dans le support allant sur la platine sur MIRCOM. (B) Vue du dish sous loupe binoculaire d'une quinzaine de vers adultes. (C) Positionnement du dish entre la fenêtre de sortie du faisceau et le microscope. (Sleiman, 2023)	23
Figure 15 : Procédé de fabrication du PDMS. 1)Le moule est fabriqué avec les micro-canaux en relief. 2)Le PDMS est coulé, la réticulation permet de solidifier le dispositif. 3)Le PDMS est décollé du moule. 4)Les puits sont percés. 5)Traitement plasma. 6)Contact avec une autre surface pour créer une liaison. (Elveflow)	24
Figure 16 : 1) CAO et 2) moule de la puce microfluidique mise au point pour l'immobilisation et l'irradiation de <i>C. elegans</i> par Rémi Courson (Ifremer Brest).3) <i>C. elegans</i> de tous stades dans un puit de la puce vus sous loupe binoculaire	26
Figure 17 : Deuxième modèle de puce microfluidique pour nématodes avec 1) la CAO, 2) la puce, et 3) la puce chargée de vers vue sous loupe binoculaire.	27
Figure 18 : CAO de la prochaine puce microfluidique pour nématodes	27

Introduction

Les rayonnements ionisants peuvent interagir avec les tissus et impacter les organismes vivants. Tous les organismes vivants sont exposés à un moment ou un autre à des rayonnements ionisants. Ils peuvent venir de sources anthropiques comme dans le milieu médical, et de sources naturelles comme pour les rayonnements cosmiques. Les quantités absorbées par un organisme sont exprimées en Grays (Gy), tandis que les doses équivalentes qui représentent l'impact sur le corps exposé, sont exprimées en sievert (Sv) (*Copplestone et al., 2001*).

Les effets des rayonnements ionisants sur l'Homme peuvent être immédiats ou mettre des années avant d'apparaître (*Mettler, 2012*). Le cancer est l'effet le plus important et répandu pouvant être causé par des expositions à des doses entre 0,05 Gy et 1 Gy (*Mettler, 2012*). Pour des doses supérieures à 1 Gy, les effets peuvent être des brûlures cutanées et même de l'immunosuppression. Lorsqu'un corps humain reçoit des doses supérieures à 2 Gy de rayonnements gamma il subit la « maladie des rayons », et à partir de 10 Gy la dose cause un dysfonctionnement global de tous les organes et est létale (*Mettler, 2012*). Des impacts génomiques sont aussi possibles, causant des mutations, mais n'ont pas encore été déterminés comme transmissibles chez l'Homme (*Doll, 1995, Mettler, 2012*). De nombreuses études ont été menées sur l'impact des rayonnements ionisants suite aux bombes atomiques, aux défaillances de centrales nucléaires, et aussi aux traitements médicaux thérapeutiques utilisant des rayonnements ionisants.

Les écosystèmes peuvent aussi souffrir de ces rayonnements, avec des impacts différents selon les milieux exposés. Les impacts sont généralement étudiés à l'échelle de l'individu, bien que les rayonnements impactent tous les niveaux biologiques (molécules, cellules, tissus, individus, communautés, écosystèmes) (*Copplestone et al., 2001*).

Le projet European Moon Village (présenté en 2016) de l'ESA prévoit de créer une base lunaire accueillant une quarantaine de personnes d'ici à 2040. Pour pouvoir réaliser ce projet, de nombreux aspects de la vie dans l'espace sont à prendre en compte, et notamment l'alimentation de cette colonie. Les contraintes économiques et techniques étant trop importantes pour réaliser des trajets Terre-Lune suffisants pour nourrir ces personnes, l'idée de produire leur propre nourriture directement sur la Lune est explorée.

Des plantes ont déjà été cultivées dans l'espace, dont les propriétés nutritionnelles sont les mêmes que celles cultivées sur Terre (*Khodadad et al., 2020*), mais afin de compléter les apports nutritionnels nécessaires, en protéines notamment, une source de nourriture animale est requise. L'aquaculture est explorée pour fournir cette source de protéines dans le cadre du projet Lunar Hatch (*Przybyla, 2021*). En effet, les espèces aquatiques vivent par définition dans l'eau sans atmosphère, et les poissons ont un facteur de conversion alimentaire plus efficace que les animaux terrestres. Le bar européen a été choisi à la suite de tests selon des facteurs que sont la durée d'incubation, leur tolérance aux variations de température, et la consommation de dioxygène des embryons. L'idée serait de transporter dans la fusée les embryons de bars, qui prennent moins de place que des adultes et n'ont pas encore besoin d'être nourris, jusqu'à la Lune où ils pourront se développer. Pour étudier l'impact du transport sur la qualité et la viabilité des embryons, plusieurs effets sont testés comme le mouvement de la fusée et les radiations subies dans l'espace.

Le projet Corafe (Cosmic Ray on Fish Embryo) a pour objectif de déterminer l'impact des rayonnements cosmiques sur les embryons, suite à l'exposition aux rayonnements ionisants présents dans l'espace pouvant présenter des risques biologiques. Ce projet est

mené en partenariat par l'UMR Marbec à Palavas, qui produit des embryons de bars, et l'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) qui a la possibilité d'irradier ces œufs.

Mon stage de recherche au LMDN (Laboratoire de Micro-irradiation, de métrologie et de Dosimétrie des Neutrons) à l'IRSN porte sur l'utilisation de puces microfluidiques pour l'irradiation de nématodes et d'œufs de poissons, et l'étude de dommages à l'ADN sur ces deux espèces. Il s'effectue en partie dans le cadre du projet Corafe en lien avec les rayonnements cosmiques, et en partie dans le cadre de la thèse de Ahmad Sleiman, en cours à l'IRSN, sur l'évaluation des effets mitochondriaux, génétiques et comportementaux de l'irradiation du système nerveux avec un microfaisceau de protons chez le nématode *C. elegans*.

La thèse d'Ahmad Sleiman se concentre sur l'impact des protons sur le système nerveux central lors de radiothérapies pour un cancer du cerveau. En effet, ces rayonnements peuvent entraîner des conséquences négatives sur les tissus sains qui sont aussi touchés lors des radiothérapies.

Dans le cadre du projet Corafe, deux périodes d'irradiation aux neutrons avec le faisceau AMANDE ont déjà été réalisées en mars et en novembre 2022 sur des œufs de bars. Les prochaines irradiations, cette fois-ci aux protons, sont prévues pour novembre 2023, et l'utilisation des puces microfluidiques devrait permettre de cibler les œufs en apportant la même dose de protons à chaque embryon. Pour *C. elegans*, les puces doivent permettre l'immobilisation des nématodes pour faciliter l'irradiation au niveau de la tête en évitant les potentiels effets invasifs de l'anesthésie jusqu'alors utilisée pour l'immobilisation qui pourraient constituer un biais potentiel pour les études du comportement.

Lors de la durée de mon stage, l'Ifremer de Montpellier qui produit des œufs de bars n'a pas pu nous en fournir, les tests ont donc été réalisés sur des œufs de poissons zèbres (*Danio rerio*), une espèce modèle, qui sont produits au laboratoire du LECO à l'IRSN sur le site de Cadarache.

Le poisson zèbre est un téléostéen d'eau douce de la famille des cyprinidés (*Mudgal & al., 2021*), qui partage 70% de sa structure génétique avec l'espèce humaine, ce qui a facilité l'utilisation de ce modèle pour la compréhension de maladies génétiques (*Choi & al., 2021*). Son génome complet a été publié en 2013, et il a été possible de créer des mutations sur plus de 14000 gènes pour explorer leurs fonctions (*Yourgenome, 2021*). *Danio rerio* est utilisé dans de nombreux domaines comme en toxicologie, en médecine, et dans des analyses du comportement social (*Mudgal & al., 2021*).

Le nématode *C. elegans* est aussi une espèce modèle. Son génome complet a été publié en 1998, avec près de 70% des gènes communs avec les humains. Ce ver possède 4 phases larvaires de L1 à L4, et les adultes pouvant se reproduire sont obtenus au bout de trois jours à 20°C, ces derniers étant majoritairement des femelles hermaphrodites ou des mâles (*Naranjo-Galindo et al., 2022*). La culture des vers est simple et rapide.

Le chimiste George Whiteside décrit la microfluidique comme "La science et technologie des systèmes permettant de manipuler de petites quantités de liquides (10^{-9} à 10^{-18} litres) en utilisant des canaux de dimensions de dix à cent micromètres". Les puces microfluidiques peuvent être utilisées dans de nombreux domaines parmi lesquels la chimie, la biologie, et les recherches médicales. Les petites quantités de liquides impliquées permettent des réactions rapides, avec une haute sensibilité, et de faibles coûts (*Ren & al.,*

2013). Le choix du matériau est crucial dans la réalisation d'une puce, et les premières, apparues dans les années 1990, étaient constituées de verre ou de silice. Les avancées technologiques en termes de matériaux ont permis de développer des polymères aujourd'hui favorisés notamment pour leur transparence, leur faible coût de fabrication, leur facilité d'utilisation, et l'absence de réaction avec les réactifs utilisés (Ren & al., 2013). Le PDMS (polydiméthylsiloxane) est l'élastomère le plus utilisé pour fabriquer des puces, mais le matériau dépend vraiment des propriétés nécessaires aux expériences à réaliser, puisque le PDMS par exemple est poreux et incompatible avec les solvants organiques (Ren & al., 2013).

La fabrication d'une puce microfluidique passe par la création du schéma avec les chambres et canaux, le choix du matériau, la création du moule, et la création de la puce. La puce pour nématode et la puce pour poisson ne sont pas fabriquées de la même façon. La puce poisson est en résine imprimée en 3D, avec un canal dans lequel viennent s'aligner les œufs. Tandis que la puce nématode est moulée avec du PDMS, et est constituée de 8 canaux.

Il était important de pouvoir vérifier que l'utilisation des puces ne causait pas de dommages sur les animaux. Pour cela, les dommages à l'ADN ont été évalués en utilisant le test comète sur les œufs de poissons zèbres. Il a été adapté sous conditions alcalines par Singh et al. (1988), et peut être appliqué à l'ADN simple et double brin. C'est un outil fiable, sensible, et rapide, vastement accepté par la communauté scientifique (Dhawan et al., 2009). Il permet de quantifier les dommages à l'ADN. Les phases de lyse et d'électrophorèse peuvent être modifiées afin de s'adapter au type de cellules ou à l'espèce étudiée.

Ce stage s'est organisé en deux parties avec un développement en parallèle des puces pour chaque espèce. La partie sur le *Danio rerio* a permis de développer, avec l'équipe d'Ifremer de Palavas-les-Flots, une puce microfluidique qui sera prête pour les irradiations de novembre, et qui a été testée pour les dommages à l'ADN et le comportement. La partie sur le nématode *C. elegans* m'a permis de développer de nombreuses compétences et connaissances scientifiques sur la maintenance de cette espèce, sur les irradiations, et sur les dommages à l'ADN, et a aussi permis d'avancer sur le développement d'une puce microfluidique qui pourra être utilisée dans le futur.

1. Contexte global

1.1. Présentation de l'IRSN

L'IRSN est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) expert des risques nucléaires et radiologiques, dont les missions sont au service des pouvoirs publics et de la population. Il a plusieurs missions parmi lesquelles la mise en œuvre de programmes de recherche, la veille en matière de radioprotection et la réalisation d'expertise, dans les domaines de la santé et de l'environnement, de la sûreté nucléaire, et de la défense (IRSN, 2021).

1.2. Présentation du LMDN

Le LMDN pour Laboratoire de Micro-irradiation, de Métrologie et de Dosimétrie des Neutrons, apporte une expertise concernant la métrologie et la spectrométrie des champs de rayonnements neutroniques. Ses activités regroupent le développement d'installations fournissant des rayonnements de référence, la réalisation d'études et de recherches sur les champs de rayonnements, et les prestations d'étalonnage et d'expertise d'instruments de radioprotection (IRSN, 2023).

1.3. Présentation du microfaisceaux MIRCOM

L'installation utilisée pour les irradiations de nématodes et d'œufs de poisson dans le cadre de ce stage est MIRCOM (Microfaisceaux d'Ions dédiées à la Radiobiologie à l'échelle de la Cellule et des Organismes Multicellulaire). Cette plateforme a été développée avec le Centre d'Études Nucléaires de Bordeaux-Gradignan (CENBG).

Le micro-faisceau utilisé est capable d'irradier avec un nombre défini d'ions d'énergie donnée et avec une précision au micromètre près, des éléments cellulaires ou même subcellulaires. Cette technologie permet de recréer de nombreuses situations d'irradiation et d'étudier des problématiques à faible et forte dose.

MIRCOM est inséré sur l'installation Amande (voir figure 1) et utilise l'accélérateur de cette dernière qui produit des faisceaux de protons et de deutrons de 100keV à 4MeV. Il est aussi accolé à un laboratoire de biologie contenant deux salles de culture cellulaire (voir figure 1) qui permettent de préparer les échantillons et de les récupérer à la suite des irradiations.

L'échantillon à irradier est placé sur un porte-échantillon, ou platine, motorisé entre le faisceau qui sort à l'air libre et un microscope à épifluorescence qui permet de viser les échantillons (IRSN, 2023).

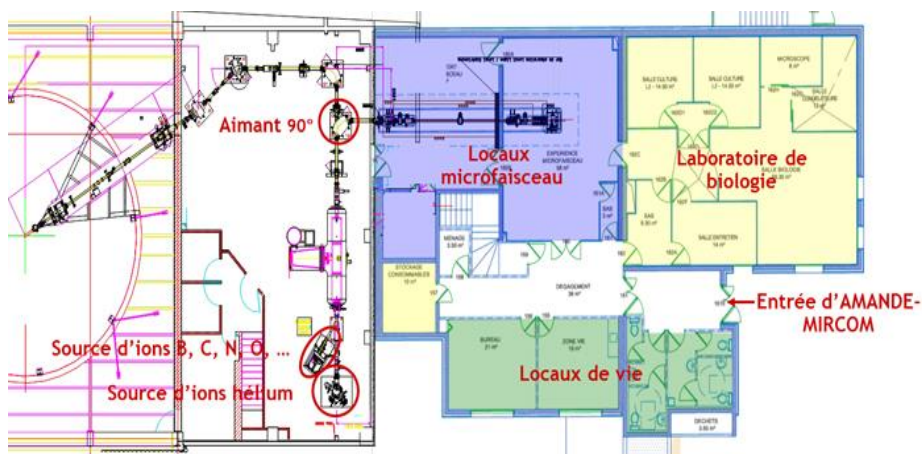


Figure 1 : Plan de la plateforme d'irradiation Amande-Mircom

1.4. Puces microfluidiques

La microfluidique est apparue dans les années 1990 et continue de se développer aujourd'hui avec de nouveaux matériaux, procédés de fabrications, et champs d'application. Une puce microfluidique est un outil composé d'un motif de canaux et de puits, moulés, gravés, ou imprimés. Les puits, qui sont en fait des trous reliant le milieu extérieur aux canaux de la puce, permettent l'injection de liquide, de gaz ou de matériel biologique.

Les avantages de l'utilisation de puces microfluidiques sont nombreux. Elles permettent d'utiliser des quantités infimes de réactifs et d'échantillons, de réaliser plusieurs manipulations en même temps sur le même outil et donc de réduire les temps d'opération, comme sur les dispositifs appelés « laboratoires sur puce » ou *lab-on-a-chip*. De plus, les paramètres comme la température peuvent être facilement contrôlés ce qui permet d'automatiser les processus. Ensuite, ces dispositifs sont facilement transportables, entièrement customisables, et globalement peu coûteux à réaliser (*Elveflow, 2023*).

Les matériaux ont évolué au cours des années devenant de plus en plus spécifiques aux applications. Les matériaux inorganiques ont été les premiers utilisés. Le verre et le silicone résistent aux solvants organiques, présentent une haute thermo conductivité, sont solides, et sont imperméables aux gaz, mais restent coûteux. Le verre est globalement le matériau le plus performant (*Ren & al., 2013*).

Quelques années après l'invention des puces, l'utilisation de polymères s'est généralisée du fait de la diversité de leurs propriétés et des applications possibles. Ils sont classés en trois groupes : les élastomères, les thermodurcissables et les thermoplastiques (*Ren & al., 2013*).

Les élastomères peuvent être déformés lorsqu'une force est appliquée, mais reviennent ensuite à leur forme initiale. Ils sont simples d'utilisation, peu coûteux, et perméables aux gaz. Ils peuvent être moulés avec une résolution au nanomètre près, et sont compatibles avec la culture cellulaire. Le PDMS (polydimethylsiloxane) fait partie de ce groupe et est le matériau le plus utilisé de nos jours en microfluidique (*Ren & al., 2013*).

Les thermodurcissables résistent à la plupart des solvants, peuvent être imprimés en 3 dimensions et sont très solides. Cependant, une fois qu'ils sont traités ils ne peuvent être de nouveau déformés, et ces polymères sont coûteux (*Ren & al., 2013*).

Les thermoplastiques peuvent être modifiés et reformés après traitement, et sont souvent utilisés dans les productions industrielles. Néanmoins, ils sont incompatibles avec la majorité des solvants inorganiques, peu perméables aux gaz, et ne sont pas biocompatibles (*Ren & al., 2013*).

L'utilisation de polymères est la plus commune, mais des puces peuvent aussi être formées à partir d'hydrogels, de matériaux composites et même de papier selon les propriétés attendues (*Ren & al., 2013*).

2. La puce microfluidique pour l'irradiation des poissons

2.1. Contexte

2.1.1. Les projets European Moon Village, Lunar Hatch, et Corafe

Dans le cadre du projet European Moon Village, le projet Lunar Hatch a pour objectif de développer et de mettre en place un système d'aquaculture spatiale en faisant venir des embryons de poissons depuis la Terre. Le système de production privilégié serait un système d'AMTI (Aquaculture multitrophique intégrée) actuellement étudié à l'UMR Marbec à l'Ifremer de Palavas-les-Flots.

En effet, une population lunaire pose la question de l'autosuffisance alimentaire, et l'aquaculture permet de répondre à de nombreuses contraintes spatiales. La consommation de poisson permet un apport conséquent de lipides, notamment d'oméga-3, et de protéines animales, alors même que le taux de conversion alimentaire de ces animaux est plus faible que celui de la majorité des espèces terrestres. De plus, les échanges gazeux sont deux à trois fois inférieurs pour un organisme aquatique comparé à un organisme non-aquatique, et ils demandent moins d'apports d'oxygène et de recyclage du CO₂ (Przybyla et al., 2022). Un autre avantage serait que les rayonnements cosmiques sont atténués par le milieu aqueux qui diminue ainsi leur impact sur les organismes aquatiques.

Le projet Corafe a pour objectif de déterminer l'effet des rayonnements cosmiques sur le développement d'embryons de poissons, pour un voyage Terre-Lune d'environ 400 000km et d'une durée de 4 jours minimum à 8 jours maximum. De précédentes recherches ont permis de choisir le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) comme espèce la plus adaptée à ce projet (Przybyla, 2021).

Lors du trajet jusqu'à la Lune, deux sources de rayonnements ionisants spatiales à haute énergie peuvent causer des risques biologiques : les rayonnements cosmiques galactiques, et les événements à particules solaires. Pour le moment, seulement des poissons d'ornement ont déjà été emmenés dans l'espace (Przybyla et al., 2022), l'effet de ces rayonnements sur des poissons destinés à la consommation est encore à déterminer.

Dans le cadre du projet Corafe, deux périodes d'irradiation aux neutrons avec le faisceau AMANDE ont déjà été réalisées. En mars 2022, une première phase d'irradiation continue a permis de tester la possibilité d'irradier des embryons de poissons, le calcul de la dose théorique reçue par les embryons dans la fusée n'ayant pas encore été réalisé. En octobre 2022, une irradiation discontinue sur trois jours a été réalisée en délivrant la dose théorique reçue. Les prochaines irradiations, cette fois-ci aux protons et sur l'installation MIRCOM, sont prévues pour novembre 2023, en utilisant une puce microfluidique.

2.1.2. Espèce modèle : le *Danio rerio*

Le *Danio rerio*, ou poisson zèbre, est un petit téléostéen d'eau douce de la famille des cyprinidés (Mudgal & al., 2021). De nombreux avantages sont associés à cette espèce, liés à son mode de vie et à son génome. Comparé aux autres espèces modèles plus communes, *Danio rerio* permet une diminution des ressources et du temps accordés à son élevage (Bailone & al., 2020). C'est une espèce résistante, non invasive, simple à élever, et produisant des centaines d'embryons à chaque reproduction (Mudgal & al., 2021). Les embryons sont transparents, ce qui permet de visualiser en temps réel leur développement, l'organogenèse, et d'analyser leurs structures internes (Choi & al., 2021).

Son génome complet de 26 206 gènes avec 1,5 milliard de paires de bases a été publié en 2013, et ils partagent 70% de sa structure génétique avec l'espèce humaine, ce qui a facilité l'utilisation de ce modèle pour la compréhension de maladies génétiques (Choi

& al., 2021). Ils présentent des organes et tissus communs avec les humains et il a été possible de créer des mutations sur plus de 14000 gènes pour explorer leurs fonctions (*Yourgenome, 2021*). Par exemple, le développement des yeux des poissons zèbres est similaire à celui des humains. Cette particularité et d'autres facteurs intéressants de l'espèce font d'elle un modèle important pour l'étude du développement et des maladies oculaires (*Richardson et al., 2017*).

Le *Danio rerio* est utilisé dans de nombreux domaines comme en toxicologie, en médecine (immunité innée, maladies humaines), et en génétique (*Mudgal & al., 2021, Choi & al., 2021*). En effet, avec le développement de nouvelles technologies de séquençage, la modélisation des maladies humaines avec ce modèle biologique a permis d'accélérer la compréhension des mécanismes moléculaires et d'identifier des potentielles options thérapeutiques (*Choi & al., 2021*). C'est aussi un modèle prometteur pour évaluer les nanomédecines, puisqu'il peut être utilisé pour prédire leur toxicité, leur biodistribution et leur efficacité thérapeutique (*Ruchika & al., 2022*).

Cette espèce est aussi utilisée dans les analyses du comportement social, et des troubles psychosomatiques du comportement (*Mudgal & al., 2021 ; Norton, Bally-Cuif, 2010*). Ces poissons sont naturellement sociaux et préfèrent vivre avec des individus de la même espèce. Leur mode de vie diurne permet de mesurer leurs comportements dans leurs conditions naturelles (*Norton, Bally-Cuif, 2010*).

En 1995, le prix Nobel de Physiologie ou Médecine a été obtenu par Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Wieschaus and Edward B. Lewis, pour leurs recherches sur le développement embryonnaire à partir des modèles de la drosophile et du poisson zèbre (*Nüsslein-Volhard, 2012 ; European Zebrafish Society, 2023*).

2.2. Matériel et méthode

2.2.1. Maintenance du poisson zèbre

- Maintenance

L'élevage des poissons zèbres est situé dans les bâtiments du LECO dans des racks Tecniplast. Les poissons sont triés selon leur sexe et sont maintenus dans une eau à 28°C. Les tests ont été réalisés sur des embryons provenant de poissons âgés d'un an et demi.

- Reproduction

La reproduction des poissons zèbres se déroule sur une période d'environ 20h incluant une phase nocturne. Tout d'abord, la veille du jour de la reproduction, les poissons sont nourris et des groupes de mâles et femelles sont placés dans des bacs équipés de récupérateurs pour les œufs, mais les deux sexes sont encore séparés par une cloison. Cette étape leur permet de partager la même eau et donc de stimuler l'ovulation chez les femelles via des phéromones sécrétées par les mâles. Les poissons zèbres ont une fertilisation externe et ont une fécondité généralement élevée, avec des femelles pouvant relâcher plusieurs centaines d'œufs en une fois (*Nasiadka et Clark, 2012*).

Cette première phase dure une nuit pendant laquelle les femelles vont ovuler (*Nasiadka et Clark, 2012*), et le lendemain la cloison est enlevée pour créer un contact physique. Suite à la ponte des œufs, les femelles sécrètent des phéromones attirant et stimulant les mâles pour la fécondation (*Nasiadka et Clark, 2012*). Enfin, les œufs sont triés dans du milieu embryon (solution mère avec 40 g de sel de mer ajouté à 1L de dH₂O, milieu

embryon avec 1,5mL de cette solution ajoutée à 1L de dH₂O, concentration finale de 60 µg/ml) afin de diminuer les densités et d'améliorer les chances de survie.

Les reproductions sont possibles toutes les semaines pour des poissons jeunes puis doivent être espacées pour des poissons plus âgés.

2.2.2. Conditions d'irradiation

○ Irradiations

Dans le cadre du projet Corafe, des embryons de bars ont été irradiés sur la plateforme AMANDE en mars et en octobre 2022. L'objectif était de recréer l'exposition qui aurait lieu dans l'espace sur une période de 8 jours pour un trajet Terre-Lune à l'intérieur d'un contenant avec de l'eau et d'une fusée. A chaque exposition, trois lots de 100 œufs ont été placés dans un aquarium tempéré et oxygéné aligné avec le faisceau (*voir figure 2*). Un lot a servi pour des tests de mortalité et d'éclosion, un autre pour de l'histologie, et un autre pour des tests comètes.

En mars les embryons ont été soumis à une dose totale de neutrons de 11,7mSv sur une période continue de 34h et 10 minutes, et en octobre, les embryons ont été exposés pendant 20h30 sur une période de trois jours pour une dose totale de 314 mSv. Des lots contrôles ont été conservés dans les mêmes conditions que les lots exposés mais sans subir d'irradiations.



Figure 2 : Dispositif d'irradiation des embryons de bars sur la plateforme AMANDE pour les manipulations de mars et octobre 2022. Les œufs sont placés dans un aquarium tempéré et oxygéné avec plusieurs compartiments, et l'aquarium est aligné avec le bout de ligne du faisceau. (Przybyla et al., 2022)

La prochaine phase d'irradiation aux protons se déroulera en novembre sur MIRCOM avec l'utilisation d'une puce microfluidique qui permettrait de viser chaque œuf un à un pour délivrer exactement la même dose d'ions. Le faisceau balayera une zone carrée de 1mm de côté pour englober l'œuf entier, les œufs de bars faisant en moyenne 1mm de diamètre, et délivrer la même dose à toutes les parties de l'œuf.

La dose peut être délivrée sur un temps aussi court qu'une minute, cependant les irradiations sont censées recréer une exposition sur une durée de trois jours, donc il a été décidé de réaliser l'exposition sur une durée de 50 minutes par œuf. En effet, cette durée permet de mieux représenter les dommages réels qui pourraient avoir lieu, en prenant en compte la capacité de réparation de l'ADN. Il est prévu de réaliser des irradiations par plage de 5 heures donc de 5 œufs irradiés à la fois, deux fois par jours pendant trois jours. Une partie des œufs sera utilisée pour des tests comètes, et une autre pour des tests de viabilité.

- Installation

La mise en place du système doit pouvoir assurer la conservation des embryons dans de bonnes conditions pour des durées d'irradiation de 5 heures environ. Pour cela, il est nécessaire d'avoir un milieu adapté, régulé en température et en oxygène.

Les différents modèles de puces ont été testés avec des poissons zèbres disponibles sur site car à cette période de l'année il n'était pas possible d'avoir des œufs de bars, d'habitude fournis par l'Ifremer de Palavas-les-Flots. Les poissons zèbres ont des œufs transparents de 1mm de diamètre, comme les bars, cependant ils sont moins sensibles aux écarts de températures, avec une température optimale à 28°C contre 16°C pour les bars, et leur chorion est plus fragile.

L'installation comporte un système de régulation de la température par bain-marie (voir figure 3), avec un petit bac contenant du milieu embryon et un bulleur pour l'oxygène, placé dans un grand bac avec un chauffage et un bulleur pour la circulation de l'eau et l'homogénéité de la température. Un contenant avec une grille est placé dans le plus petit bac pour les témoins, et la température est contrôlée avec un thermomètre. Une pompe péristaltique est placée à côté (voir figure 3) et permet un flux de milieu constant sans entrer en contact avec ce milieu.

Le chauffage permet de garder une eau à $28\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Il y a aussi un système de chauffage sur MIRCOM qui permet de réguler la température du bout de ligne à 28°C.

Le flux de milieu se fait via des tubes, et le débit ne doit pas dépasser 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour ne pas endommager ni les œufs ni la puce. Pour cela, des tests de débit par pesée d'eau ont été réalisés et ont permis de choisir la vitesse de 0,9 tour/min.



Figure 3 : Photo de l'installation pour les tests de la puce microfluidique pour embryons de poissons avec le système de bain-marie (à gauche), la pompe péristaltique (au centre), le bout de ligne de MIRCOM (à droite).

2.2.3. Création de la puce microfluidique

Le design des puces a été réfléchi en équipe entre les personnes travaillant sur le projet Corafe à l'Ifremer de Palavas-les-flots, l'équipe de MIRCOM au LMDN, et Rémi Courson de l'Ifremer de Brest qui est aussi celui qui fabrique les puces.

Le design de la puce est prévu pour qu'elle puisse s'imbriquer directement entre le micro-faisceau et le microscope sur MIRCOM, sans avoir besoin d'un support.

La puce est faite en résine DS-3000, qui est un matériau biocompatible et translucide, et la partie du canal exposée aux irradiations en surface de la puce est fermée par un adhésif double-face et un film de polypropylène (PP) de 4µm.

2.2.4. Évaluation des dommages

- Test comète

Le premier test comète a été mis en place en 1984 par Ostling et Johanson en conditions neutres, puis il a été développé en conditions alcalines par Singh et al. en 1988. Le test en conditions alcalines permet une meilleure reproductibilité et un test plus spécifique. Le test comète est une méthode sensible, directe, peu coûteuse, plutôt simple, et applicable à de nombreux domaines comme en toxicologie, en recherche fondamentale sur la réparation de l'ADN, en biosurveillance et en diagnostic environnemental (Lu et al. 2017).

Les tests comètes permettent de détecter des cassures d'ADN simple ou double brin, de visualiser ces cassures via des comètes (voir figure 4), et de quantifier les dommages. Pour s'adapter aux différentes lésions de l'ADN et aux différentes espèces étudiées, plusieurs versions du test comètes existent aujourd'hui (Moller et al., 2014).

Le protocole général pour un test comète en conditions alcalines comporte une fixation des cellules isolées sur une lame avec de l'agarose, une lyse des cellules, un déroulement des brins d'ADN, une électrophorèse pour faire migrer les fragments d'ADN, et une lecture des résultats au microscope électronique en transmission suite à une coloration de l'ADN.

Les comètes se présentent sous la forme d'une tête comportant le corps nucléaire, et d'une queue représentant la trace des fragments ayant migré avec le courant électrique (voir figure 4). Les paramètres mesurés les plus utilisés sont le pourcentage d'ADN dans la queue appelé *tail intensity* (TI), la longueur de la queue, et le produit des deux appelé *tail moment* (TM) (Moller et al., 2014). Le pourcentage d'ADN dans la queue est un paramètre très utilisé puisqu'il est directement lié de façon linéaire à la fréquence de cassure des brins (Lu et al. 2014).



Figure 4 : Cellules sans dommage à l'ADN (à gauche), et cellules avec des dommages à l'ADN appelées comètes (à droite) (Bright, 2011)

Dans le cadre des tests réalisés sur poissons zèbres, le protocole utilisé (voir annexe 1) est un protocole qui a été mis en place et validé au LECO. L'acquisition des résultats a été faite avec le logiciel Comet IV de Perspective Instrument, à la suite de l'exposition des lames au SYBR Gold 1X.

- Fréquence cardiaque

La mesure de la fréquence cardiaque peut être utilisée pour contrôler le bien-être des poissons (Yousaf et al., 2022).

Les tests de fréquence cardiaque des embryons de poissons zèbres ont été réalisés sur deux lots d'embryons à 72hpf (heures post fécondation). Les œufs ont été fécondés au même moment, et proviennent de trois groupes de reproducteurs avec 3 mâles et 2 femelles par groupe. Le lot 1 a été utilisé pour tester des techniques d'insertion et de retrait des œufs dans la puce à 6hpf, et a donc été mis et retiré de la puce microfluidique, tandis que le lot 2 a été mis dans la puce à 20 hpf et laissé pendant 5h sur MIRCOM dans les conditions d'irradiations (flux de 100 μ L/min de milieu embryon à 28°C). Le lot 1 contenait 15 embryons mis dans la puce et 15 contrôles, et le lot 2 contenait 20 embryons mis dans la puce et 20 contrôles. Les embryons contrôles ont été gardés dans un milieu embryon à 28°C \pm 0,5°C

A 72hpf, les larves ont été mises en contact avec une solution de méthylcellulose à 2% pour empêcher les mouvements, et une solution de benzocaïne pour les endormir, puis elles ont été acclimatées pendant 2 minutes. Les manipulations ont été faites dans une pièce tempérée à 28°C, et les animaux ont été manipulés par groupe de 5 individus. La fréquence cardiaque a été calculée avec le logiciel Danioscope à partir d'une vidéo de 20 secondes prise sur le logiciel Ethovision en utilisant une caméra liée à un microscope. Les résultats sont donnés en BPM (battements par minute) et en BPS (battements par seconde).

2.3. Résultats

2.3.1. Développement de la puce microfluidique

Chaque modèle de puce a été réfléchi en équipe avec l'équipe d'Ifremer de Palavas-les-Flots et l'équipe du LMDN s'occupant du projet Corafe. Les puces ont été réalisées par Rémi Courson à l'Ifremer de Brest. Lorsque l'on recevait les puces mon travail était de tester les puces, de faire des comptes-rendus sur les améliorations à apporter et les problématiques auxquelles je m'opposais, de proposer des modifications et de trouver des solutions. Je participais aussi à l'organisation des réunions concernant le projet Corafe, et j'étais présente lors de ces réunions pour pouvoir rédiger des comptes-rendus de réunion.

○ Premier modèle

Le processus de développement doit permettre de créer une puce microfluidique qui répond à trois objectifs majeurs que sont la réduction au minimum de la manipulation des œufs pour l'insertion et le retrait dans la puce, la visibilité des œufs pour l'irradiation, et l'intégrité des embryons dans la puce.

Pour commencer, la première puce créée possède plusieurs caractéristiques intéressantes (*voir figure 5*) :

- La forme du canal permet l'insertion de nombreux œufs dans la puce à l'aide de coudes à 90°.
- L'entrée et la sortie du canal sont sur le même côté de la puce pour faciliter l'installation sur MIRCOM.
- Le canal se resserre vers la sortie pour empêcher que les œufs sortent de la puce avec le courant lors de l'insertion ou de l'installation.
- Les deux trous présents en bas de la puce permettent de fixer la puce sur le support entre le bout de ligne du rayon et le microscope.
- La résine transparente doit permettre une bonne visibilité pour pouvoir viser les œufs avec le microscope, et le film fermant le canal doit être assez fin pour ne pas trop interférer avec les particules.

Les œufs sont donc insérés par l'entrée de la puce, et se retrouvent bloqués au centre qui est la fenêtre d'irradiation. L'entrée et la sortie permettent aussi de faire passer un flux de milieu tempéré et oxygéné.

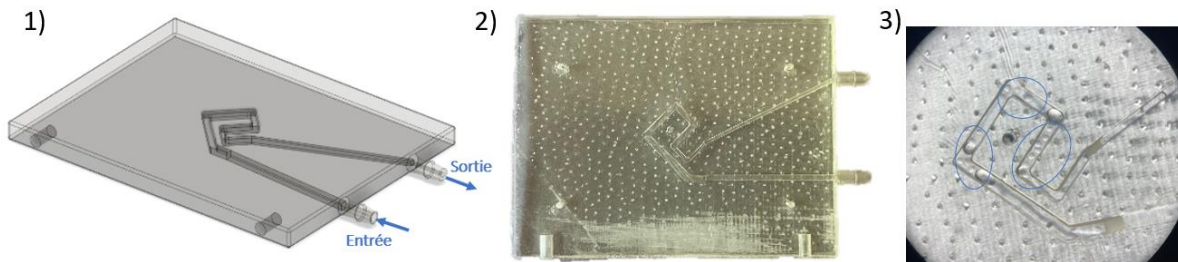


Figure 5 : Première puce microfluidique pour embryons de poissons testées, avec 1) la CAO (Conception Assistée par Ordinateur), 2) la puce, et 3) la puce vue sous loupe binoculaire avec des embryons.

Les premiers tests de la puce ont permis de déterminer qu'il était possible d'insérer une quinzaine d'œufs en utilisant une seringue de 5mL connectée à un tube de 0,5mm de diamètre intérieur, mais cette technique prend beaucoup de temps (minimum une heure). L'objectif est l'irradiation de 5 œufs, mais pouvoir en insérer un grand nombre permet de réaliser des tests en duplicats ou triplicats pour évaluer l'effet de la puce.

Quelques problématiques ont été relevées :

- Les trous permettant de positionner la puce sur la platine sont trop courts et ne sont pas assez éloignés.
- Les points visibles sur la puce (*voir figure 5*) sont causés par l'impression en 3D et pourraient potentiellement gêner la visibilité.
- Les œufs se bloquent dans les coudes lors de l'insertion et du retrait, ce qui risque d'endommager les embryons, et ce qui fait perdre du temps lors des manipulations.

○ Deuxième modèle

Le second modèle corrige le blocage des œufs dans le canal avec un canal en arc de cercle en éliminant tous les coudes. Cette puce a aussi des trous plus éloignés et plus profonds pour pouvoir l'insérer sur la platine motorisée sur MIRCOM, et sur deux côtés opposés au cas où il y aurait besoin de la tourner. De plus, une fine couche de PDMS a été ajoutée sur la face côté microscope pour améliorer la transparence (*voir figure 6*).

Un autre problème a été relevé qui est le maintien de la température. Les bars ont besoin d'une eau à 13°C et sont très sensibles aux changements de température, et du fait du montage il y a une longueur de 1,5m de tuyau du bac avec l'eau tempérée à la puce, ce qui risque de provoquer des pertes de charge et donc une augmentation de la température, et il n'est pas possible de climatiser l'enceinte. Pour pallier cela, un deuxième canal a été ajouté (*voir figure 6*) proche du premier pour faire passer un flux d'eau froide et permettre un meilleur contrôle de la température.

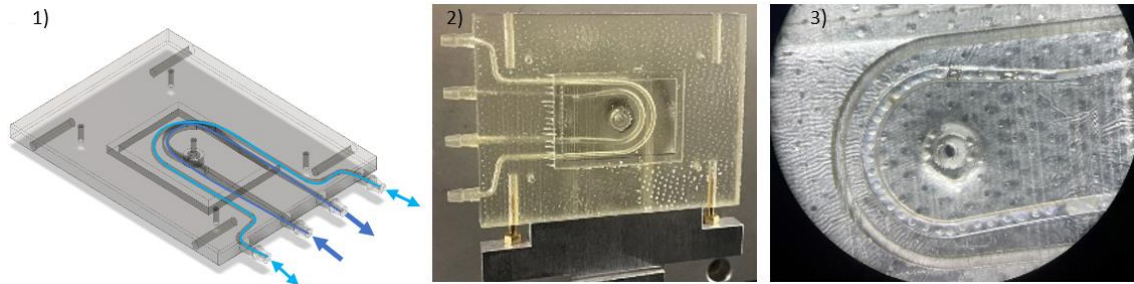


Figure 6 : Photos de la seconde puce microfluidique avec 1) la CAO, 2) la puce sur la platine motorisée sur MIRCOM, et 3) la puce avec des œufs vue sous loupe binoculaire

La nouvelle puce peut être placée sur la platine sur MIRCOM (voir figure 6), mais les trous sont trop serrés et doivent être élargis. En effet, l'espace est très serré pour poser la puce entre le microscope et la fenêtre de sortie du faisceau, et il est difficilement possible de forcer pour la retirer surtout avec les tuyaux permettant le flux de milieu. La puce s'enlevant par le dessus, il faut aussi pouvoir la tenir par les côtés ce qui est gêné par le nouveau canal.

Cette deuxième puce a donc été testée pour l'insertion et le retrait des œufs, et pour la visibilité sur MIRCOM.

L'insertion et le retrait des œufs ont été fortement améliorés par le nouveau design, mais les œufs arrivent à aller se bloquer dans la partie plus serrée du canal. La technique d'insertion des œufs avec la seringue pose aussi un souci de bouchon dans la partie de liaison entre la seringue et le tube, et la pression appliquée par la seringue est compliquée à contrôler. Afin de contrer ces problèmes, une autre technique rapide et efficace a été trouvée qui consiste à couper le bout d'une pipette en plastique pour s'adapter sur l'entrée du canal, aspirer des œufs, les aligner dans le bout de la pipette, puis les faire « couler » par gravité et avec un peu de pression dans la puce. Utiliser la pipette pour enlever les œufs de la puce est aussi ce qui a été trouvé de plus simple et rapide. La facilité d'insertion des œufs a permis d'en insérer une quarantaine avec plus d'une vingtaine dans la zone d'irradiation en moins d'une dizaine de minutes.

La visibilité a été testée avec l'équipe de MIRCOM pour vérifier qu'il était possible de viser les œufs dans la puce pour les irradiations. Les picots causés par l'impression de la puce peuvent facilement être confondus pour des embryons, et les embryons sont très flous (voir figure 7). Afin de résoudre cela, la solution envisagée est de poncer la puce pour retirer les picots, puis d'appliquer une fine couche de PDMS.

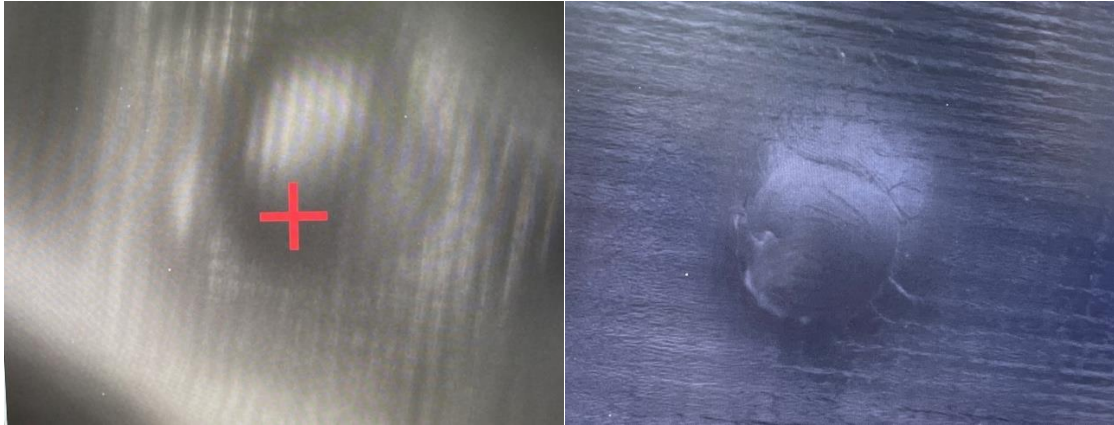


Figure 7 : Photo de l'écran de l'ordinateur connecté au microscope sur MIRCOS permettant de viser les embryons pour l'irradiation (à gauche), la croix rouge est supposée être sur un embryon, et photo du même écran avec un picot causé par l'impression 3D de la puce (à droite).

○ Troisième (et potentiellement dernier) modèle

D'autres modifications sont prévues pour la prochaine puce :

- Élargir les trous pour le support,
- Poncer la puce et appliquer une couche de PDMS,
- Mettre l'entrée et la sortie du canal de refroidissement de l'autre côté de la puce,
- Ajouter un plot, arrondi pour épouser la forme d'un œuf et ne pas l'abîmer, dans le canal des œufs pour qu'ils ne puissent pas aller se bloquer dans la partie resserrée,
- Mettre potentiellement un système d'embouts Luers sur les tuyaux pour faciliter la connexion de la puce aux tuyaux et empêcher la formation de bulles.

La personne qui fabrique les puces, a eu le temps de faire la CAO de la prochaine puce dans laquelle il y a le plot, et le canal de refroidissement de l'autre côté (voir figure 8).

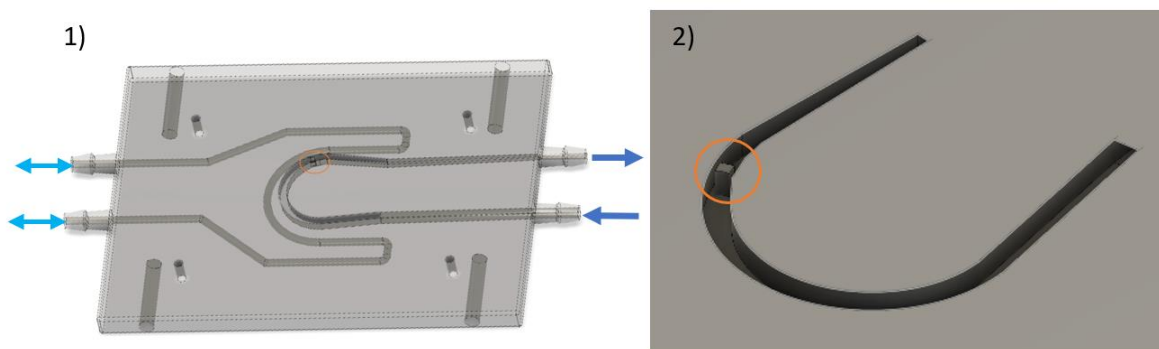


Figure 8 : 1) CAO du troisième modèle de la puce microfluidique pour embryons de poissons, 2) le plot dans le canal est clairement visible.

2.3.2. Analyse des données des tests comètes des irradiations précédentes de mars et octobre 2022 sur embryons de bars

J'ai récupéré les données des tests comètes des irradiations d'octobre 2022, ce qui correspond à une centaine de comète par lame. J'ai ensuite analysé les données des tests comètes suite aux expositions de mars et d'octobre 2022.

- Analyse statistique d'un test comète

Le traitement des données d'un test comète peut être réalisé selon trois modèles statistiques différents : un modèle par cellule individualisée, un modèle par lame, et un modèle par individu (*Bright et al., 2011*). Dans ce cas-ci le modèle par individu n'est pas possible puisque chaque test a été réalisé avec un pool de 5 individus, et le modèle par cellule est très compliqué puisque sur chaque lame sont lues une centaine de cellules. Le modèle le plus pertinent est le modèle par lame avec un facteur traitement fixe et un facteur lame aléatoire. Pour les données récupérées, le traitement appelé *Exposed* correspond aux embryons exposés aux rayons ionisants, tandis que le *Control* correspond aux embryons conservés dans les mêmes conditions que les *Exposed* mais sans irradiation.

Ensuite, le TM est utilisé car il regroupe les informations de l'intensité de l'ADN dans la queue et de la longueur de la queue comme expliqué précédemment. Normalement les cellules avec un TI supérieur à 85% sont appelées des hérissons et sont retirées des analyses car elles correspondent à des cellules mortes ou mourantes et peuvent fausser les résultats (*Moller et al. 2014*).

La distribution des TM n'est pas normale, donc les données peuvent être log-transformées pour tout de même suivre une loi normale (*Moller et al. 2014*). Pour pouvoir faire cela, les données étant égales à 0 peuvent soit être omises, ce qui risque de fausser les résultats, soit être remplacées par une très faible valeur, ce qui est plutôt recommandé puisque les TM à 0 sont des cellules avec peu ou pas de dommages (*Bright et al. 2011, Gagnaire et al. 2020*). Dans l'analyse réalisée, les données nulles ont été remplacées par les plus petites valeurs des séries (entre $7 \cdot 10^{-5}$ et $6 \cdot 10^{-4}$).

La valeur statistique utilisée ici pour la comparaison est la moyenne par lame puis la moyenne par traitement. Il est courant d'utiliser soit la médiane soit la moyenne des groupes pour l'analyse statistique, mais ça ne fait que très peu de différence (*Moller et al. 2014*). Les analyses ont été faites en utilisant les moyennes et les médianes, mais puisqu'il n'y avait pas de différence notable dans les résultats, les analyses ont finalement été réalisées à partir des valeurs moyennes. Pour finir, on réalise un test de permutation avec le package *pgirmess* avec 2000 permutations (*Gagnaire et al. 2020*). Le test de permutation va se baser sur une distribution empirique des données construite avec les données, pour estimer la significativité. Les permutations vont permettre de casser les relations entre les variables dépendantes et les variables indépendantes pour pouvoir se placer dans la situation de l'hypothèse nulle (*Delladata, 2018*).

Les analyses statistiques doivent permettre de vérifier s'il y a un effet significatif des irradiations et de la dose sur les dommages à l'ADN. Les tests statistiques ont été réalisés sur RStudio (version 4.3.0) à partir d'un script précédemment écrit pour d'autres traitements statistiques de tests comètes.

- Résultats des tests comètes des irradiations de mars 2022

Après une transformation logarithmique des données, on voit que les moyennes des lames exposées (1,68 pour h24 et 2,02 pour h48) sont globalement légèrement supérieures

à celles des lames contrôles (1,15 pour h24 et 0,90 pour h48) (voir figure 9, et annexe 2). On remarque aussi que les valeurs à h48 sont plus élevées pour les lames exposées que pour h24.

Ces deux observations font penser qu'il y a un effet de l'irradiation et un effet de la dose, ce qui est ensuite confirmé par les p-value significatives (voir annexe 2) à la suite des tests de permutation.

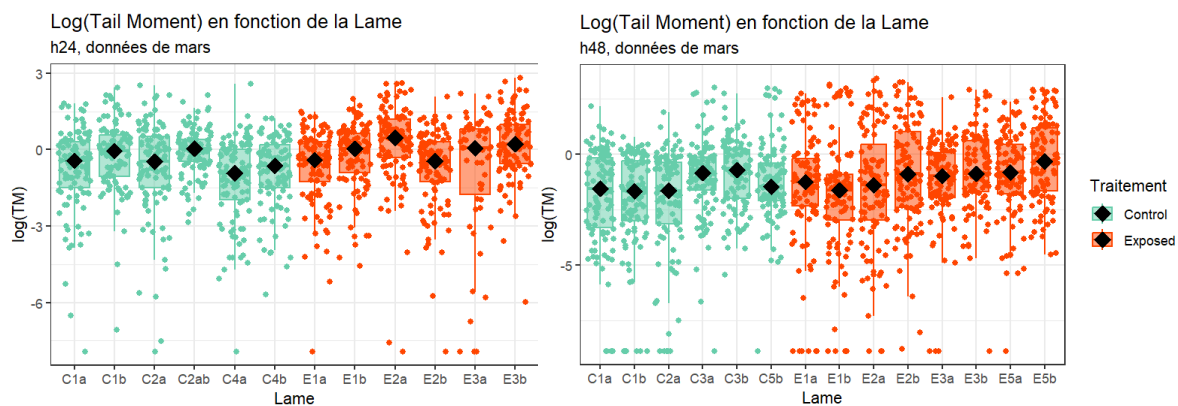


Figure 9 : Graphiques de la comparaison des moyennes des log des Tail Moment des comètes par lame, pour les expositions de mars 2022 au bout d'un jour d'irradiation (h24 à gauche) (4,7mSv) et de deux jours d'irradiation (h48 à droite)(11,7mSv).

○ Résultats des tests comètes des irradiations d'octobre 2022

On peut voir que globalement les valeurs des lames exposées sont supérieures à celles des lames contrôle, sauf pour 2 lames à h24 et 1 lame à h72 (voir figure 10). On retrouve pour octobre une augmentation presque par 3 dans les lames exposées entre h24 et h72 qui fait penser à un effet de dose, avec des moyennes de 2,34 pour h24 et de 6,32 pour h72 (voir annexe 2). Pour h72 il y a aussi une valeur de moyenne de TM presque trois fois plus importante pour les lames exposées que pour les lames contrôles (6,32 contre 2,31), mais ça ne se retrouve pas pour h24 avec une valeur contrôle supérieure à la valeur exposée bien que les valeurs soient proches (3,13 pour la valeur contrôle et 2,34 pour l'exposée). Suivant ces observations, il semble y avoir un effet dose entre les deux lots et un effet de l'exposition pour le lot h72, mais pas d'effet exposition pour le lot h24.

On obtient des p-value qui permettent d'affirmer qu'il y a un effet dose significatif et un effet de l'exposition significatif pour h72, mais que l'effet exposition n'est pas significatif pour h24.

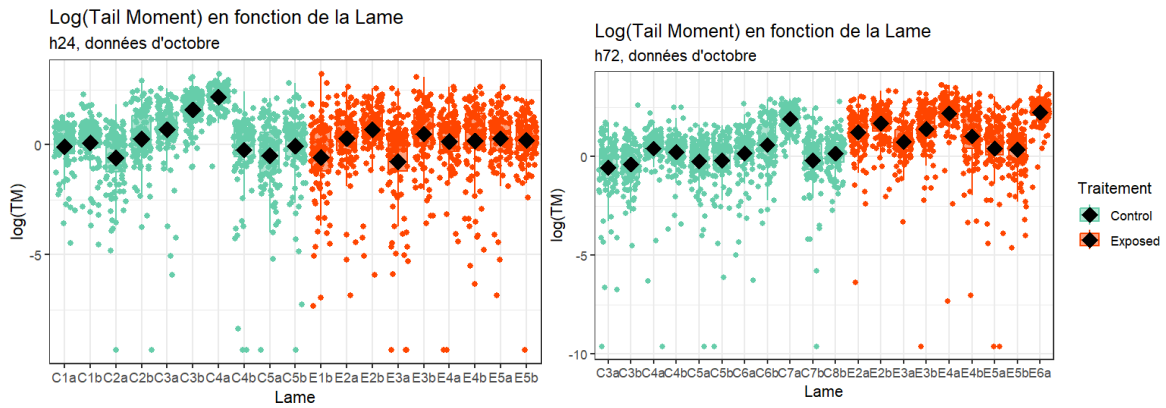


Figure 10 : Graphique de la comparaison des moyennes des log des Tail Moment des comètes par lame, pour les expositions d'octobre 2022 au bout d'un jour d'irradiation (h24 à gauche) (138mSv) et de trois jours d'irradiation (h72 à droite) (314mSv).

De plus, en comparant avec les résultats des expositions de mars, on peut voir que les moyennes augmentent lorsque les doses augmentent. Cependant, on remarque aussi que les valeurs moyennes pour les lots contrôles d'octobre sont supérieures à celles de mars, ce qui amène à se demander s'il n'y a pas eu des conditions d'irradiation différentes au niveau du contrôle de la température, du transport, de l'oxygénation, ou même de la ponte des œufs avec des géniteurs différents, ce qui expliquerait aussi la valeur contrôle supérieure à la valeur exposée pour h24. De plus, les irradiations ayant été discontinues (pas d'irradiations la nuit), il est possible qu'il y ait eu des réparations de l'ADN.

2.3.3. Analyse statistique des dommages causés par la puce microfluidique chez les embryons de poissons zèbres

o Test comètes

Les valeurs moyennes pour les lots Puce sont supérieures aux valeurs moyennes pour les lots Control (voir figure 11). Cependant, le test de permutation montre avec les p-value <0,05 que ces différences ne sont pas significatives. Il n'y a donc pas de différence significative ni entre les lots Puce et les lots Control, ni entre les lots testés à 6hpf et à 20hpf. Ces résultats font donc penser qu'il n'y a pas de dommages à l'ADN causés par la puce aux embryons de poissons zèbre.

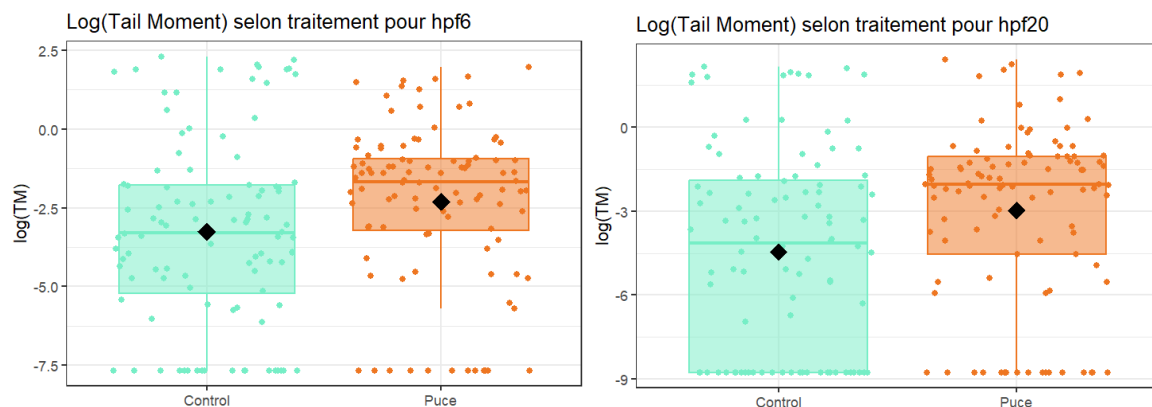


Figure 11 : Graphiques du log des valeurs de Tail Moment (TM) en fonction du traitement (Control et Puce) pour des embryons à 6hpf (à gauche) et 20 hpf (à droite).

- Fréquence cardiaque

La moyenne de la fréquence cardiaque d'un poisson zèbre à 72 hpf se situe autour de 170 BPM, avec des marges allant de 150 à 210BPM (Frayssse et.al 2006, Pylatiuk et al. 2014).

Les données inférieures à 100 BPM ont été retirées car considérées comme aberrantes et comme résultant de mauvaises manipulations, ou de problèmes d'acquisition (poissons sur le ventre, logiciel ne détectant pas de battement).

Les résultats ont été analysés sur RStudio avec un test de Student non-apparié (Pylatiuk et al. 2014) à la suite d'un test de Shapiro-Wilk pour vérifier la normalité des résultats, et une vérification de l'homogénéité des variances.

Les moyennes du lot 1 sont proches, 162 BPM et 164BPM, et ne semblent pas montrer de différence significative (voir figure 12). Cette observation se retrouve sur le lot 2 avec des moyennes proches avec 182BPM et 193BPM. De plus, ces deux lots ont des valeurs moyennes dans la norme pour un poisson zèbre à 72hpf. Cependant, il y a une différence notable d'environ 25 BPM entre les deux lots avec une fréquence plus importante pour le deuxième lot.

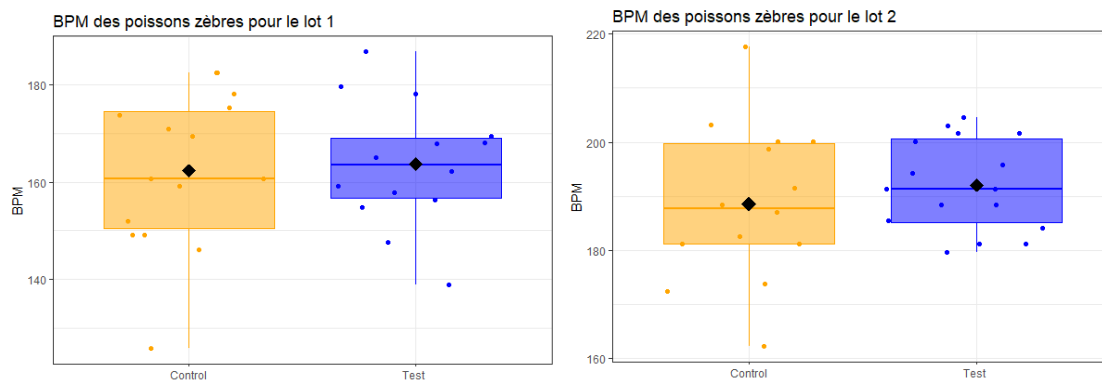


Figure 12 : Graphique de la distribution des valeurs de BPM des deux lots de poissons zèbre, le lot 1 à 6 hpf et le lot 2 à 20 hpf

Les tests de Student montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les groupes Test et les groupes Control des deux lots, le lot 1 ayant une p-value de 0,8024, et le lot 2 une p-value de 0,4440.

Cependant, il y a une différence significative entre les groupes test des deux lots (p-value = $7,5859 \cdot 10^{-8}$). Le lot 2 présente en moyenne un BPM plus rapide, donc une légère tachycardie, ce qui peut être expliqué par des facteurs de stress.

2.4. Discussion et conclusion partielle

Les résultats obtenus à la suite des tests de la puce semblent montrer que la puce microfluidique ne cause pas de dommages à l'ADN. De plus, il n'a pas été noté de malformations pendant les manipulations. Il y a eu une légère tachycardie pour le lot resté 5 heures dans la puce qui peut avoir été causée par un stress.

Les tests ont été menés sur des embryons de poissons zèbres, mais on a remarqué une forte mortalité dans les embryons. En effet, après vérification, on a obtenu des taux de mortalité de 68%, alors que les essais sont généralement réalisés sur des lots ayant des taux de mortalité de 30% maximum. Ces taux peuvent être expliqués par l'âge avancé des géniteurs, et les résultats ont pu être influencés par des dommages qui étaient déjà présents chez les embryons. Les œufs de poissons zèbres sont aussi plus fragile que les œufs de bars qui résisteront certainement mieux aux manipulations.

On peut dire que lors des prochaines irradiations, les effets remarquables sur les embryons seront des effets causés par les irradiations et pas par la puce microfluidique. Toutefois il semble intéressant lors de la prochaine expérimentation du mois de novembre, d'avoir un groupe témoin en conditions optimales dans un aquarium et un autre groupe témoin dans une puce sans irradiation, afin de tester cela.

Le développement de la puce microfluidique a permis d'arriver à une puce potentiellement terminée qui permettra de réaliser des irradiations en novembre. La puce finale comporte un canal pour charger les œufs avec un plot pour empêcher le blocage des œufs, et un canal pour refroidir la puce. Son design permet de la placer directement sur la platine motorisée sur MIRCOM. La prochaine puce sera certainement fabriquée en septembre, puis il est prévu que des tests soit réalisés en octobre sur la visibilité des œufs, l'efficacité du plot, et sur l'installation globale des tuyaux par l'équipe Corafe de l'Ifremer de Palavas-les-Flots. Elle pourra potentiellement être modifiée une dernière fois avant les irradiations prévues en novembre. La visibilité pourrait être améliorée en ajoutant une source lumineuse sur MIRCOM, et sinon il pourrait être envisagé de colorer les œufs pour mieux les voir.

La puce microfluidique sera certainement prête pour les irradiations de novembre une fois que la dernière version aura été fabriquée. Je pense que le prochain défi majeur sera la mise en place de la puce sur MIRCOM avec la connexion aux tuyaux pour ne pas avoir de bulles, et la maîtrise de la température.

Concernant l'analyse des tests comètes des irradiations précédentes aux neutrons sur œufs de bars, on retrouve un effet dose et un effet de l'irradiation. Cet effet est compatible avec les connaissances existantes sur les effets de l'irradiation gamma chez le poisson zèbre, montrant l'induction significative de dommages à l'ADN à partir de 100mGy (*Pereira et al., 2012*) Il serait intéressant d'analyser cet effet dose puisque les doses absorbées ne sont pas toujours linéairement liées aux effets biologiques induits (*Copplestone et al., 2001*). Des tests histologiques et de viabilité sur les embryons des irradiations de mars 2022 avaient déjà montré des résultats similaires, et les témoins à t0 ne montraient pas de différence avec les témoins à t24h. On s'attendrait potentiellement aux mêmes résultats pour les prochaines irradiations aux neutrons.

3. La puce microfluidique pour l'irradiation des nématodes

La deuxième partie de ce rapport se concentre sur le développement d'une puce microfluidique pour l'irradiation du nématode *C. elegans* dans le cadre de la thèse de Ahmad Sleiman, et sur les techniques de maintenance et d'évaluation des dommages de ce nématode.

3.1. Contexte

3.1.1. Présentation de la thèse de Ahmad Sleiman

La thèse d'Ahmad Sleiman porte sur l'« Évaluation des effets mitochondriaux, génétiques et comportementaux de l'irradiation du système nerveux avec un microfaisceau de protons chez le nématode *C. elegans* », et sera soutenue en octobre 2023. Elle a pour but d'étudier l'impact des expositions aux protons qui sont utilisés pour traiter les cellules cancéreuses, à partir du modèle *C. elegans* (Sleiman, 2023). En effet, les séances de radiothérapie chez les patients atteints de cancer sont très courantes (plus de 50% des cas), mais l'utilisation de rayonnements est accompagnée d'une irradiation indésirable des parties saines proches de la tumeur. Dans les cas de radiothérapie cérébrale se pose la question de l'impact des rayonnements ionisants sur le système nerveux central (Sleiman, 2023).

Des micro-irradiations ont été réalisées en visant le système nerveux central des nématodes à l'aide du microfaisceau MIRCOM.

L'étude s'est faite au niveau moléculaire sur la fonction mitochondriale et l'ADN nucléaire, mais aussi au niveau comportemental sur les comportements moteurs, sensoriels et cognitifs (Sleiman, 2023).

Cette thèse démontre que les protons induisent un dysfonctionnement mitochondrial, et fournit des données pour la caractérisation des effets des protons sur les cellules nerveuses non-cancéreuses dans le cadre de l'utilisation de la protonthérapie en tant que traitement du cancer (Sleiman, 2023).

3.1.2. Espèce modèle : *Caenorhabditis elegans*

Le nématode *C. elegans* est un petit ver transparent de 1mm de long au stade adulte. Ce ver possède 4 phases larvaires de L1 à L4, et les adultes pouvant se reproduire sont obtenus au bout de trois jours à 20°C, ces derniers étant majoritairement des femelles hermaphrodites ou des mâles (0,1%) (Naranjo-Galindo et al., 2022). L'embryogenèse dure environ 16h à 20°C, et les œufs permettent aux embryons de se développer de façon indépendante. Lorsque l'œuf éclot, on obtient une larve au stade L1 qui va durer 12 heures, tandis que les autres phases larvaires durent 8 heures (voir figure 13), et chaque phase se termine par une période de mue. Le passage à l'état adulte hermaphrodite dure 18 heures, et l'hermaphrodite va pouvoir produire des œufs de façon autonome pendant 2 à 3 jours. Les adultes vont vivre pendant 2 à 3 semaines (Rieckher et al., 2017).

En cas de manque de nourriture causé par exemple par une surpopulation, les larves peuvent se mettre en stade dauer. Ce stade peut être considéré comme une dormance pendant laquelle les larves vont continuer à se mouvoir mais ne vont plus se nourrir. Le stade dauer peut durer plusieurs mois, puis la larve s'active de nouveau en présence de nourriture, et reprend son cycle de vie où il s'était arrêté.

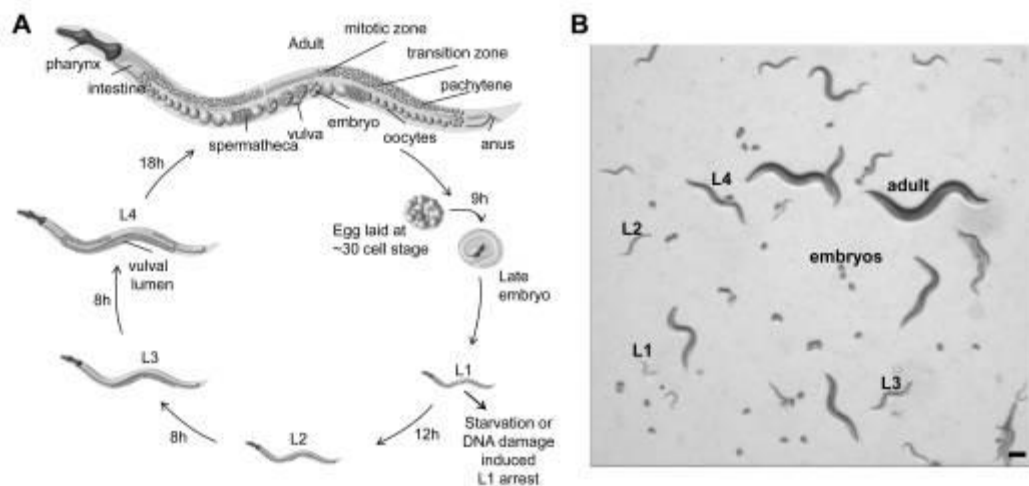


Figure 13 : Cycle de vie de *C. elegans* et stades de développements. (a) Schéma du cycle de vie de l'embryon, en passant par les 4 stades larvaires de L1 à L4 jusqu'à l'adulte fertile. Un cycle est complété en 2,5 jours sous 20°C avec OP50 sur boîte NGM. Les adultes pondent 300 œufs qui éclosent sous 9 heures avec un développement ex-utéro. (b) Image montrant un mélange de plusieurs stades de développement sur une boîte gélosée. La barre de mesure fait 100μm. (Rieckher et al., 2017)

Sydney Brenner, lauréat du prix Nobel de Physiologie ou médecine de 2002 avec John Sulston et Robert Horvitz, a établi *C. elegans* comme une espèce modèle dans les années 60 (Naranjo-Galindo et al., 2022, Bratic et al., 2010). Il y a aussi eu les prix Nobel de Physiologie ou médecine de 2006 obtenu par Andrew Fire et Craig Mello, et le prix Nobel de Chimie de 2008 obtenu par Martin Chalfie, en utilisant le modèle de *C. elegans*. De nombreux avantages font de cette espèce une espèce modèle.

Tout d'abord, la culture des vers est simple et rapide, elle prend peu de place et nécessite peu de matériel. Il est possible de congeler les vers, de les garder plusieurs mois au congélateur, et de récupérer ensuite des vers viables après décongélation. Les vers sont petits, se reproduisent facilement, rapidement, et en grande quantité, et ils sont transparents ce qui facilite les observations et les colorations. C'est aussi une espèce qui est bénigne pour l'Homme, et qui ne peut pas survivre à température corporelle (Corsi et al., 2015).

Le génome complet de *C. elegans* a été publié en 1998, avec près de 70% des 19 000 gènes communs avec les humains. De plus, son système nerveux est entièrement cartographié pour ses 302 neurones, et les interactions des neurones, synapses et neurotransmetteurs sont similaires aux mammifères (Naranjo-Galindo et al., 2022). Il a aussi été le premier organisme eucaryote à avoir son génome entièrement séquencé (Corsi et al. 2015).

La base de données en ligne Wormbook regroupe de multiples informations et protocoles sur ce nématode, et est constamment mise à jour. *C. elegans* peut être utilisé dans de nombreux domaines d'études comme en recherche biomédicale, pour l'étude par exemple de la neurodégénérescence, de l'instabilité génomique, et du dysfonctionnement mitochondrial (Bratic et al., 2010, Naranjo-Galindo et al., 2022).

3.2. Matériel et méthode

3.2.1. Maintenance des *C.elegans*

○ Culture

Les souches de nématodes sont commandées auprès du CGC (the *Caenorhabditis* Genetics Center, University of Minnesota), et conservées à -80°C.

Les nématodes sont élevés sur un milieu NGM (Nematodes Growth Medium) (*NaCl*, *Agar*, *Peptone*, *5mg/ml cholestérol dans de l'éthanol*, *tampon KPO4 1M pH 6.0*, *1M MgSO4*) ensemencés avec *E. coli* souche OP50. Cette souche est préparée en solution et peut être conservée à 4°C pendant plusieurs mois. Les boîtes ensemencées sont ensuite passées sous UV pour stériliser le milieu pour éviter les contaminations, et les contaminations croisées avec les cultures cellulaires des salles de culture du laboratoire de biologie (voir figure 1). La culture des nématodes en milieu liquide est aussi possible.

○ Congélation

Lorsque les souches ne sont pas activement utilisées pour des tests, elles sont conservées indéfiniment dans une solution de congélation à -80°C. Les nématodes réagissant le mieux à la congélation et à la décongélation sont les stades L1-L2 ayant subi une étape courte de privation de nourriture juste avant la congélation.

Pour la congélation, une boîte de Pétri avec de nombreux vers est lavée avec du M9 (3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl , 1 ml 1 M MgSO_4 , H_2O à 1L, stériliser à l'autoclave) et centrifugée plusieurs fois pour enlever les bactéries. Le culot est ensuite mis en contact avec la solution de congélation à base de glycérol, homogénéisé, et placé au congélateur à -80°C.

○ Synchronisation

La synchronisation est un protocole permettant d'éliminer tous les vers d'un échantillon pour ne récupérer que les œufs et avoir un groupe de vers d'âge homogène. Elle est utile par exemple dans notre cas car les irradiations sont effectuées sur vers adultes.

Les vers sont récupérés des boîtes NGM avec du M9, centrifugés, puis mis au contact avec une solution à base d'hypochlorite de sodium pendant quelques minutes, qui va tuer les vers mais ne va pas impacter les œufs, puis rincés et centrifugés de nouveau. Les œufs propres sont ensuite ensemencés sur une nouvelle boîte de Pétri avec NGM et *E. coli* OP50.

3.2.2. Conditions d'irradiations

Pour l'irradiation des vers, il faut préparer des dish avec des vers anesthésiés (voir figure 14). Les dish sont des supports en plastiques permettant de créer un puit avec un film de polypropylène de 4µm qui ne gêne pas l'exposition. Dans ce puit sont ensuite placés des vers adultes hermaphrodites anesthésiés au levamisole. Des tests ont préalablement été réalisés pour tester cet anesthésique et les concentrations adaptées. Les vers adultes peuvent donc être mis en contact avec une solution de 10mM de M9-levamisole sans impact sur l'intégrité du ver. Une fois les nématodes dans le puit, ils sont couverts d'une fine couche de gel d'agarose à 2% et d'une lamelle ronde de 9mm pour unifier la surface du gel (ce qui permet de garder la même mise au point du microscope pendant les irradiations).

Ce dish est ensuite placé dans un support adapté qui est lui-même placé sur une platine motorisée, entre la fenêtre de sortie du faisceau et le microscope sur *MIRCOM* (voir figure 14).

Les irradiations des nématodes se sont déroulées sur *MIRCOM*. Le système nerveux central de chaque ver est visé à l'aide du microscope, et exposé à un microfaisceau de protons de 4 MeV. Le système nerveux central est considéré comme étant l'anneau nerveux se situant de 2,5 μ m à 50 μ m dans la tête d'un *C. elegans* (Sleiman, 2023). La dose totale reçue est de 220 Gy de protons. En moyenne, une dizaine de nématodes adultes sont irradiés par dish, et cette procédure dure environ 30 minutes.

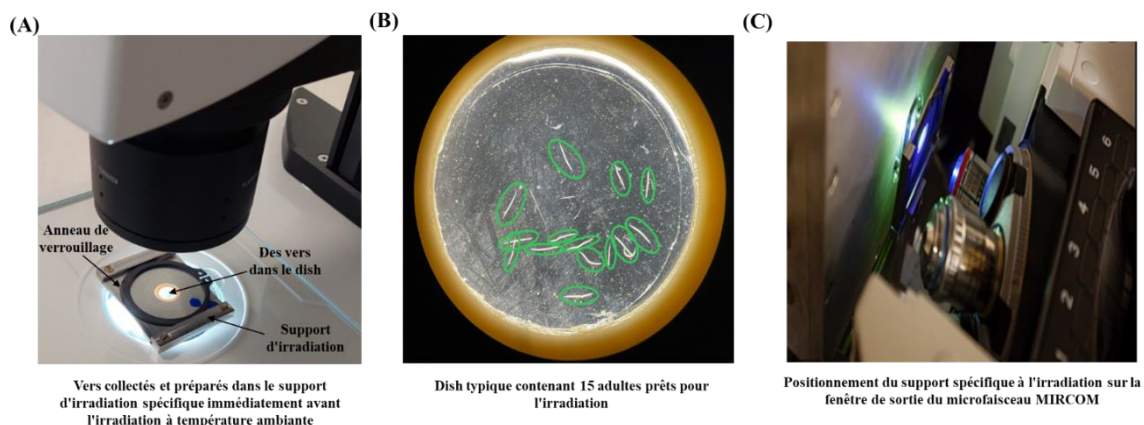


Figure 14 : Préparation des échantillons pour l'irradiation. (A) Dish avec nématodes dans le support allant sur la platine sur *MIRCOM*. (B) Vue du dish sous loupe binoculaire d'une quinzaine de vers adultes. (C) Positionnement du dish entre la fenêtre de sortie du faisceau et le microscope. (Sleiman, 2023)

3.2.3. Développement de la puce microfluidique pour l'irradiation de *C. elegans*

J'ai réalisé les tests sur les puces microfluidiques pour nématodes qui consistaient à faire entrer les vers adultes à l'intérieur des canaux. J'ai aussi réalisé des comptes-rendus à Ahmad Sleiman car la puce fait partie de son projet de thèse, et à Rémi Courson qui fabriquait les puces, afin d'exposer les problématiques, et de proposer et de déterminer quelles étaient les améliorations possibles.

○ Objectif

Pour pouvoir irradier les vers, il faut que ceux-ci soient immobiles afin de réussir à les viser tout d'abord avec le microscope puis à les irradier. Jusqu'ici, les vers sont immobilisés en utilisant du levamisole qui est un anesthésique, ils sont lavés après irradiation et retrouvent toute leur mobilité environ 24 heures après contact.

Les effets de l'anesthésique ne sont pas tous connus et pourraient potentiellement impacter les nématodes. De plus, le temps de récupération des nématodes ne permet pas d'analyses de comportement directement après irradiation et pourrait amener à passer à côté d'effets directs des irradiations.

L'utilisation d'une puce microfluidique pour l'irradiation des nématodes a pour objectif d'immobiliser les vers adultes sans créer de dommages et sans utiliser d'anesthésique pour les endormir, tout en permettant l'irradiation. Les vers doivent rester bloqués dans le canal sans pouvoir faire demi-tour ou continuer à avancer, la puce doit être assez transparente pour pouvoir viser les vers et assez solide pour permettre la mise en place et le retrait de ces derniers. Il faudrait aussi qu'il soit possible de mettre une dizaine voire une vingtaine de vers dans la puce.

○ Matériau

La puce est moulée en PDMS et fermée par une couche de PDMS et un film de PP de 4µm. Le PDMS est le matériau le plus communément utilisé en microfluidique.

Pour pouvoir fabriquer une puce microfluidique en PDMS, il faut d'abord créer un moule avec la matrice de la puce en relief. Le matériau est ensuite mélangé avec un agent de durcissement, les bulles sont retirées dans une chambre à vide, et le PDMS est coulé dans le moule puis mis en réticulation pour solidifier la puce. Le PDMS peut rester plusieurs heures à l'air libre sans durcir même après mélange avec l'agent durcissant, et est donc simple à mouler (*Elveflow, 2023*).

L'utilisation d'un moule permet la réplication en grand nombre du même dispositif. Ensuite, lorsque le matériau est refroidi, il est possible d'y percer les différents puits pour connecter la puce au milieu extérieur. Cette technique est appelée « technique de lithographie douce » (*Xia et Whitesides, 1998*).

Pour la puce microfluidique pour l'irradiation des nématodes, la puce en PDMS est liée par traitement plasma à une fine feuille de polypropylène. Pour cela une couche de PDMS est étalée de façon uniforme sur la feuille de polypropylène à l'aide d'une tournette puis mise au contact de la puce à la suite d'un traitement plasma. Cette technique permet de fabriquer des puces multicouches qui peuvent avoir de nouvelles propriétés. Par exemple, un collage peut être fait avec une lamelle de verre et de bénéficier des propriétés du verre, comme la possibilité d'intégrer des électrodes et des résistances, ou de faire des dépôts de couches métalliques ou diélectriques sur la lamelle, ce qui est impossible sur le PDMS (*Elveflow, 2023*).

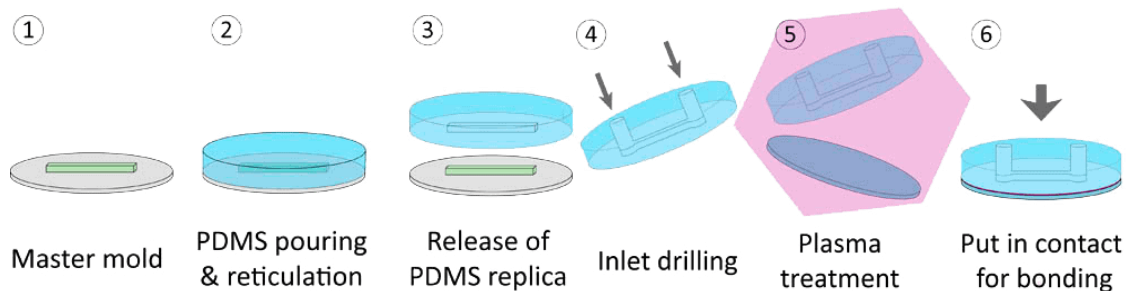


Figure 15 : Procédé de fabrication du PDMS. 1)Le moule est fabriqué avec les micro-canaux en relief. 2)Le PDMS est coulé, la réticulation permet de solidifier le dispositif. 3)Le PDMS est décollé du moule. 4)Les puits sont percés. 5)Traitement plasma. 6)Contact avec une autre surface pour créer une liaison. (*Elveflow*)

Le PDMS a de nombreuses propriétés (*Elveflow, 2023*) :

- Il est imperméable à l'eau, au glycérol, au méthanol et à l'éthanol et ne les laisse pas le déformer, donc pas de déformation des micro-structures
- Il est transparent aux fréquences optiques, ce qui permet l'observation facile des micro-canaux à l'œil nu ou sous microscope
- Il a une autofluorescence faible
- Il est déformable et permet l'ajout de vannes et de connecteurs
- Il est perméable aux gaz, ce qui est bien pour pouvoir faire des cultures cellulaires mais est un problème pour l'évaporation de l'eau
- Il permet de créer des structures avec une résolution allant jusqu'à quelques nanomètres

Quelques problèmes sont tout de même à noter. Le PDMS peut se déformer et gonfler au contact de certains produits chimiques (diisopropylamine, chloroforme, éther, acétone, propanol, pyridine). L'interaction avec des solvants est le désavantage majeur de

l'utilisation du PDMS puisque sa déformation entraîne la déformation des canaux (*Raj et Chakraborty, 2020*). C'est aussi un matériau qui vieillit mal et dont les propriétés mécaniques peuvent être modifiées au cours des années.

De nombreux tests de biocompatibilité ont été réalisés avec du PDMS et ils ont montré que ce matériau est un excellent choix en culture cellulaire. Il est aussi couramment utilisé comme matériau structurel pour les études in vivo et in vitro, et pour les bioessais et les systèmes microfluidiques implantables (*Raj et Chakraborty, 2020*). L'avantage de sa biocompatibilité permet de travailler avec du matériel biologique vivant dans les micro-canaux comme des bactéries ou des nématodes.

3.2.4. Évaluation des dommages sur *C.elegans* dans le cadre de la thèse d'Ahmad Sleiman

○ Isolement des cellules et Test comète

Pour voir si des cassures dans les brins d'ADN ont été formées pendant/suite aux irradiations, et puisque ce test est maîtrisé sur poissons zèbres au LECO, et a déjà été réalisé par Erica Maremonti (*Maremonti et al., 2019*) sur vers entiers, nous avons pensé faire un test comète sur les têtes des vers irradiés.

Les irradiations se font sur le système nerveux central dans la tête, donc l'objectif est de séparer la tête du reste du corps, et d'appliquer le protocole de division cellulaire du Wormbook, qui est constitué de plusieurs étapes de lavage et de lyse, et de réaliser un test comète sur les cellules isolées.

Tout d'abord il a fallu acquérir la compétence du découpage des têtes et de l'isolement des cellules pour obtenir des cellules isolées viables (test au bleu de trypan, test coloration de l'ADN au Hoechst). Il a aussi fallu déterminer la quantité de têtes minimum requise pour pouvoir récupérer des cellules après isolement (puisque de nombreuses cellules sont perdues dans le traitement).

Ensuite, il a fallu appliquer le test comète aux cellules de vers et déterminer la quantité de vers nécessaire pour obtenir des comètes visibles, et faire un test positif avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

○ qPCR

La qPCR permet de suivre la multiplication de brins d'ADN en continu à l'aide d'un marqueur intercalant de l'ADN comme le SYBR Green (Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green High ROX qPCR Master Mix). Dans le cas de l'analyse des dommages chez *C. elegans*, la qPCR est utilisée pour mesurer le nombre de copies de l'ADN mitochondrial chez des vers après irradiation.

Le nombre de copies de l'ADN mitochondrial peut être modifié par des facteurs de stress oxydatif, et la modification de ce nombre donné a pour conséquence des altérations du fonctionnement normal des cellules (*Sleiman, 2023*). La qPCR permet de quantifier ce nombre de copies de l'ADN mitochondrial dans les têtes de nématodes.

Les protocoles d'irradiation, d'extraction et de préparation des échantillons pour la qPCR étant décrits précisément dans la thèse d'Ahmad Sleiman (*Sleiman, 2023*), seuls les éléments majeurs de la qPCR sont repris ici. A la suite de l'irradiation des nématodes, les vers sont lavés avec du M9, puis une dizaine de têtes sont récupérées pour préparer des échantillons d'ADN. Les extractions d'ADN ont été réalisées avec des kits Sigma Extract-N Amp (catalogue # kit XNAT2), avec des modifications dans les instructions suivant le Wormbook. L'extrait peut ensuite être utilisé directement ou stocké à -80°C. Pour préparer

les échantillons pour la qPCR, on ajoute 25 μL de ddH₂O à l'extrait d'ADN, on prépare le mélange avec les amorces, l'extrait d'ADN, le SYBR Green, et du ddH₂O, pour un volume total de 10 μL .

De nombreuses amorces ont été testées, et les amorces COX-4 ont été utilisées pour l'ADN nucléaire, et ND-1 pour l'ADN mitochondrial. La qPCR se déroule en deux étapes de 10 minutes à 95°C, puis 40 cycles de PCR.

- Comportement

L'étude du comportement des vers après irradiation permet de vérifier l'impact des rayonnements sur le comportement des nématodes. Le logiciel Wormlab a été créée pour étudier les comportements des vers, en filmant les vers en temps réel de façon automatisée. Cette technologie permet d'accéder aux données de vitesse, de direction, de distance, de posture et autres, et de pouvoir les analyser. Les interactions sociales sont aussi quantifiées, comme la recherche de nourriture en groupe et l'accouplement (Sleiman, 2023). On a pu avoir une séance de formation au logiciel pour apprendre les multiples commandes et utilisations de Wormlab.

3.3. Résultats

3.3.1. Développement de la puce

- Design initial

Les premiers designs de puces ont été réalisés par l'entreprise FinnAdvance en 2022, mais de nombreux problèmes sont vite apparus : canaux trop grands qui permettaient aux vers d'opérer un demi-tour dans le canal, coûts élevés.

Les dernières puces ont ensuite été réalisées par Rémi Courson d'Ifremer avec le même objectif de bloquer les vers pour les irradiations. Le premier design testé (voir figure 16) est constitué de 8 canaux avec chacun un puit d'entrée et de sortie, et un rétrécissement progressif du canal de l'entrée (200x200 μm) vers le centre de la puce (40x40 μm). Les dimensions de la puce correspondent aux dimensions du support utilisé pour les irradiations sur MIRCOM.

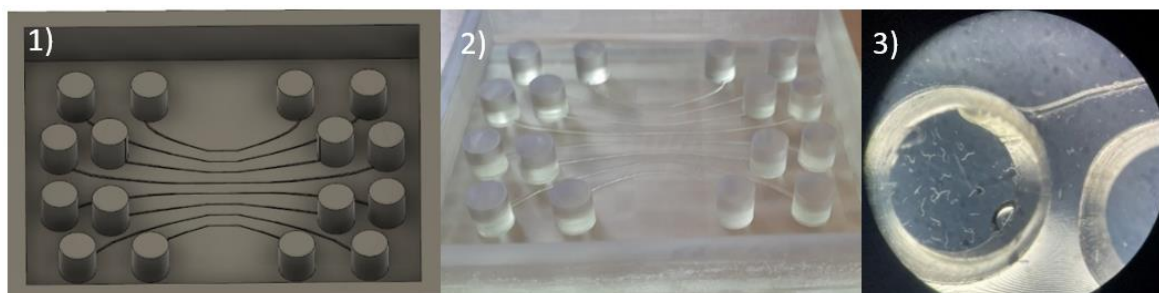


Figure 16 : 1) CAO et 2) moule de la puce microfluidique mise au point pour l'immobilisation et l'irradiation de *C. elegans* par Rémi Courson (Ifremer Brest). 3) *C. elegans* de tous stades dans un puit de la puce vus sous loupe binoculaire

Les premiers essais ont montré que les vers ne rentraient pas dans le canal (voir figure 16). Des vers de tous les stades ont été placés dans des puits, et ont été poussés et aspirés à l'aide de pipettes dans les canaux. Seulement des petits vers (des stades L1) ont été retrouvés dans les canaux, et ils ne sont pas rentrés par eux-mêmes.

En voyant la taille de l'ouverture du canal par rapport à la taille d'un ver adulte, il a été pensé qu'un ver adulte n'avait pas la place pour entrer dans le canal et qu'il fallait donc agrandir les entrées.

- Deuxième puce

Le second modèle de puce présentait des ouvertures de canaux de 600 μm de large pour 500 μm de hauteur avec toujours un rétrécissement progressif vers le centre pour bloquer les nématodes (*voir figure 17*). Avec cette puce, les vers rentrent dans les canaux, et on retrouve des vers jusqu'à des L3 au centre. Pour faciliter l'insertion dans les canaux, on a réalisé des tests de différence de pression, et un test d'attraction des vers avec une solution de diacétyl.

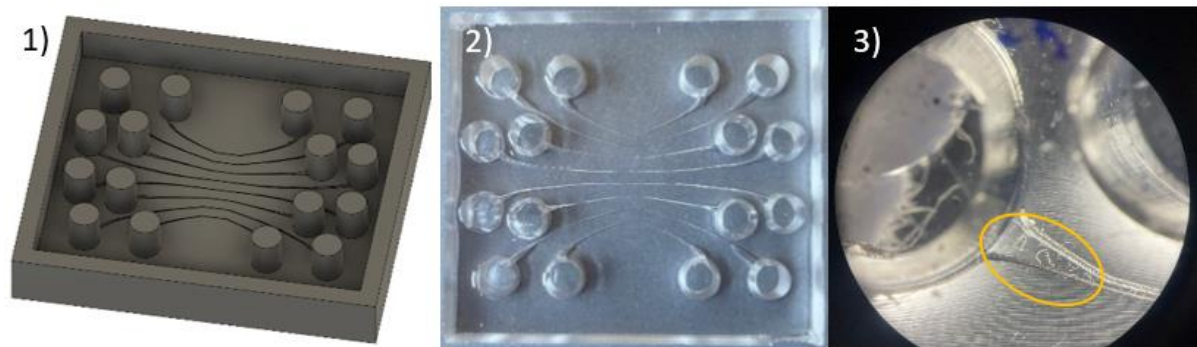


Figure 17 : Deuxième modèle de puce microfluidique pour nématodes avec 1) la CAO, 2) la puce, et 3) la puce chargée de vers vue sous loupe binoculaire.

Cependant à la suite d'un test avec seulement des vers adultes, on a pu voir qu'ils semblaient couler au fond des puits et ne plus bouger.

- Prochaine puce

La puce microfluidique suivante aura des puits moins larges, et des entrées de canaux à la taille des puits pour que les nématodes entrent facilement dans le canal. Elle pourra être utilisée pour de potentielle futures études de *C. elegans*.

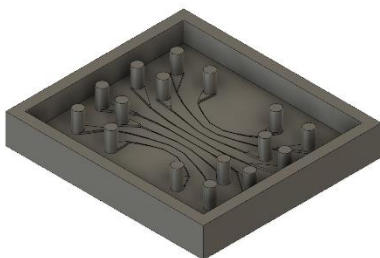


Figure 18 : CAO de la prochaine puce microfluidique pour nématodes

3.3.2. Résultats des dommages sur *C.elegans* dans le cadre de la thèse d'Ahmad Sleiman

○ Isolement des cellules

Un protocole d'isolement des cellules de *C. elegans* a été établi à partir des protocoles trouvés sur le Wormbook (« *Isolating and culturing L2 – L4 cells* ») et du protocole de Imanikia et al. 2016 (voir Annexe 3).

Pour commencer il faut séparer les têtes des nématodes. Pour cela on place les vers sur une lame en verre dans une goutte de M9, et on utilise la pointe d'une seringue métallique en biseau pour manipuler les vers et couper les têtes. Les têtes sont coupées juste après le bulbe du système nerveux central (voir figure 13), et récupérées dans un tube avec 10µL de ddH₂O sur la glace pour éviter la détérioration des cellules. Il faut agir plutôt rapidement car la lampe de la binoculaire chauffe les nématodes et sèche le M9.

Ensuite il y a plusieurs étapes de lavage au ddH₂O et de centrifugation, et un contact pendant 4 minutes avec 200µL d'une solution de SDS-DTT qui permet de dénaturer les protéines. Plusieurs lavages sont ensuite réalisés avec une solution de tampon Egg pour neutraliser la solution de SDS-DTT (voir Annexe III). Une solution de 0,5% de Triton X-100/SDS-DTT peut aussi être utilisée mais il n'y a pas eu de différence notée avec la solution de SDS-DTT.

Enfin, l'échantillon est mis en contact pendant maximum 15 minutes avec une solution de papaïne (10 mg/mL, conservation à -20°C) qui va réaliser une lyse enzymatique des tissus, tout en réalisant une lyse mécanique avec un Potter. Il est aussi possible d'utiliser une solution de Pronase E qui a les mêmes effets que la papaïne, mais dans ce cas le temps de contact est de 25 à 30 minutes. La réaction enzymatique est arrêtée par 1mL de FBS froid, et plusieurs lavages sont réalisés au PBS 1X.

L'échantillon n'est pas filtré à la fin du protocole puisque les volumes ne permettent pas de récupérer assez de cellules qui restent bloquées sur la gaze.

Les cellules récupérées peuvent être observées après coloration au bleu de trypan ou avec du Hoechst.

○ Test comète

Le test comète en conditions alcalines permet de quantifier les cassures d'ADN. Pour vérifier l'efficacité du test comète sur les cellules de *C. elegans* on a réalisé un test comète positif en utilisant une solution de peroxyde d'hydrogène à 5mM avec un temps de contact de 15 minutes, et un test comète témoin avec des individus non exposés au peroxyde d'hydrogène. La lecture des lames n'a pas permis de confirmer ou d'infirmer la présence de comètes ou de cellules puisqu'on ne distinguait pas avec certitude de cellules et de comètes. En effet, on pense que les cellules de la tête du nématode sont trop petites pour pouvoir être vues au microscope avec un objectif 100, ou bien que le protocole n'étant pas spécifique des nématodes la lyse des cellules, le déroulement de l'ADN ou la migration de l'ADN n'ont pas été concluantes.

○ Autres résultats

Les résultats des qPCR réalisées et des tests de comportements ont été analysés et reportés par Ahmad Sleiman dans son manuscrit de thèse (Sleiman 2023).

3.4. Discussion et conclusion partielle

La puce microfluidique pour nématodes doit permettre leur immobilisation pour les irradiations sans utilisation d'anesthésique. Les modèles de puce créés ne permettent pour le moment pas de faire entrer les vers adultes dans les canaux. Cependant, des vers de stades moins évolués ont pu entrer dans les canaux et même les traverser, ce qui fait penser qu'il est aussi possible de faire entrer les adultes dans le canal, mais qu'il manque encore quelque chose pour les y encourager. Toutefois, cette approche est prometteuse car de telles puces en PDMS ont déjà été développées pour des nématodes irradiés avec des microfaisceaux verticaux et les auteurs de l'étude ont montré que la puce n'impactait pas la physiologie du nématode (*Suzuki et al., 2018*).

D'autres procédés microfluidiques peuvent être explorés si la puce ne permet finalement pas le blocage des vers. Il est possible d'ajouter des pompes sur la puce qui créeront des différences de pression pour déformer les canaux en enserrant les vers à l'intérieur. En créant une puce multicouche avec une lame de verre il serait aussi envisageable d'immobiliser les vers par un faible courant électrique, ou bien d'ajouter des sources de CO₂ pour endormir les nématodes (*Gupta et Rezaei, 2016*). Sinon, en gardant le même modèle de puce, il pourrait être intéressant d'ajouter un courant continu de M9 à l'aide d'une pompe en-dehors de la puce (*Hulme et al., 2007*), un peu comme avec la puce pour les embryons de poisson, qui permettrait de pousser les vers dans le canal. Nous avons aussi essayé d'attirer les nématodes avec du diacétyl, mais ils pourraient aussi être attirés par l'odeur de bactéries lactiques (*Choi et al., 2016*).

Une puce plus avancée pourrait être créée lorsqu'une solution sera trouvée. Cette puce permettrait d'élever les vers depuis la phase œuf jusqu'à l'âge adulte, de les irradier et de les analyser (tests comportementaux) dans la même puce (*Hulme et al., 2010*). Ce concept serait comme un laboratoire-sur-puce pour nématodes.

Les qPCR ont permis de fournir des informations utiles dans le cadre de la thèse d'Ahmad Sleiman (*Sleiman, 2023*).

Le protocole d'isolement des cellules peut permettre des tests sur cellule individualisée, et potentiellement un futur test comète. Il serait intéressant de développer le test comète sur les cellules de têtes de nématodes en changeant certains paramètres.

4. Conclusion globale

L'utilisation de puces microfluidique pour l'irradiation précise de matériel biologique est un procédé très intéressant et avantageux une fois développé. Le développement est long et les puces peuvent s'avérer fragiles, mais les possibilités d'utilisation et de modification des dispositifs sont très nombreuses.

Nous avons réussi à développer une puce microfluidique pour embryons de poisson qui pourra permettre les irradiations de ces embryons en novembre, et nous avons aussi réussi à avancer sur le développement d'une puce pour l'irradiation de nématodes qui pourrait s'avérer être un outil très utile dans le futur.

La puce pour poisson est composée de deux canaux avec un canal de refroidissement, et un canal pour l'insertion des œufs avec un plot pour empêcher leur sortie. La puce servira pour les irradiations de novembre prochain pour le projet Corafe. Les tests réalisés n'ont pas montré de dommages sur les embryons à la suite d'une insertion dans la puce et une mise en situation d'irradiation. Cependant, l'analyse des tests comètes des précédentes irradiations réalisés montre un effet dose et un effet irradiation, bien que de nombreux facteurs sont à remettre en cause.

Concernant la puce pour nématodes, elle est composée de 8 canaux avec des puits de chaque côté, et permet l'insertion des vers de stades L1 à L3 dans les canaux, mais pas encore des vers adultes.

Ce stage m'a permis de développer de nombreuses compétences et connaissances. Le fait de travailler dans une équipe pluridisciplinaire au LMDN m'a beaucoup plu et m'a beaucoup appris sur les rayonnements et les irradiations. Les études des espèces modèles que sont *Danio rerio* et *Caenorhabditis elegans* ont développé mes connaissances en termes de maintenance de ces espèces, de leur cycle de vie, et de l'analyse des dommages à l'ADN. J'ai pu travailler sur du test comète, sur de l'isolement cellulaire, sur de l'immunofluorescence, sur du comportement, et sur des qPCR.

Les avancées réalisées dans le cadre de ce stage, même si elles sont toute petites, ont permis d'aider dans deux grands projets que sont l'aquaculture lunaire et l'analyse des effets de la radiothérapie.

Bibliographie

- BAILONE, Ricardo Lacava, FUKUSHIMA, Hirla Costa Silva, VENTURA FERNANDES, Bianca Helena, DE AGUIAR, Luís Kluwe, CORRÊA, Tatiana, JANKE, Helena, GREJO SETTI, Princia, ROÇA, Roberto De Oliveira et BORRA, Ricardo Carneiro, 2020. Zebrafish as an alternative animal model in human and animal vaccination research. *Laboratory Animal Research*. 7 mai 2020. Vol. 36, n° 1, pp. 13. DOI [10.1186/s42826-020-00042-4](https://doi.org/10.1186/s42826-020-00042-4).
- BRATIC, Ivana, HENCH, Jürgen et TRIFUNOVIC, Aleksandra, 2010. Caenorhabditis elegans as a model system for mtDNA replication defects. *Methods*. 1 août 2010. Vol. 51, n° 4, pp. 437-443. DOI [10.1016/j.ymeth.2010.03.003](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.03.003).
- BRIGHT, Jonathan, AYLOTT, Mike, BATE, Simon, GEYS, Helena, JARVIS, Philip, SAUL, Jim et VONK, Richardus, 2011. Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay. *Pharmaceutical Statistics*. novembre 2011. Vol. 10, n° 6, pp. 485-493. DOI [10.1002/pst.530](https://doi.org/10.1002/pst.530).
- CHOI, Jae Im, YOON, Kyoung-hye, SUBBAMMAL KALICHAMY, Saraswathi, YOON, Sung-Sik et IL LEE, Jin, 2016. A natural odor attraction between lactic acid bacteria and the nematode Caenorhabditis elegans. *The ISME Journal*. mars 2016. Vol. 10, n° 3, pp. 558-567. DOI [10.1038/ismej.2015.134](https://doi.org/10.1038/ismej.2015.134).
- CHOI, Tae-Young, CHOI, Tae-Ik, LEE, Yu-Ri, CHOE, Seong-Kyu et KIM, Cheol-Hee, 2021. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental & Molecular Medicine*. mars 2021. Vol. 53, n° 3, pp. 310-317. DOI [10.1038/s12276-021-00571-5](https://doi.org/10.1038/s12276-021-00571-5).
- COPPLESTONE, D, BIELBY, S, JONES, SR, PATTON, D, DANIEL, P et GIZE, I, 2001. *Impact Assessment of Ionising Radiation on Wildlife* [en ligne]. juin 2001. Environment Agency, Rio House, Waterside Drive, Aztec West, Almondsbury, BRISTOL, BS32 4UD. Disponible à l'adresse : https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1148332/sr-dpub-128-e-e.pdf
- CORSI, AK, WIGHTMAN, B et CHALFIE, M, 2015. A Transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans. The C. elegans Research Community, WormBook. 18 juin 2015.
- DELLADATA, 2018. Tests de permutation avec le logiciel R. [en ligne]. 12 avril 2018. [Consulté le 10 mars 2023]. Disponible à l'adresse : <https://delladata.fr/tests-de-permutation-avec-le-logiciel-r/>
- DHAWAN, Alok, BAJPAYEE, Mahima et PARMAR, Devendra, 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*. 1 février 2009. Vol. 25, n° 1, pp. 5-32. DOI [10.1007/s10565-008-9072-z](https://doi.org/10.1007/s10565-008-9072-z).
- ELVEFLOW, 2023. Le PDMS (Poly-Di-Methyl-Siloxane) et la microfluidique. *Elveflow* [en ligne]. [Consulté le 2 mai 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.elveflow.com/archives-fr/poly-di-methyl-siloxane-pdms-et-la-microfluidique/>
- ELVEFLOW, 2021. Microfluidics: A general overview of microfluidics. *Elveflow* [en ligne]. 5 février 2021. [Consulté le 10 août 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/a-general-overview-of-microfluidics/>
- EUROPEAN ZEBRAFISH SOCIETY, 2023. Christiane Nüsslein-Volhard Award. [en ligne]. [Consulté le 9 août 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.ezsociety.org/cnv-award>
- FRAYSSE, Benoit, MONS, Raphael et GARRIC, Jeanne, 2006. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1 février 2006. Vol. 63, n° 2, pp. 253-267. DOI [10.1016/j.ecoenv.2004.10.015](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.015).

GAGNAIRE, Béatrice, ARCANJO, Caroline, CAVALIÉ, Isabelle, CAMILLERI, Virginie, SIMON, Olivier, FLORIANI, Magali, ORJOLLET, Daniel et ADAM-GUILLERMIN, Christelle, 2020. Tritiated Water Exposure in Zebrafish (*Danio rerio*): Effects on the Early-Life Stages. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2020. Vol. 39, n° 3, pp. 648-658. DOI [10.1002/etc.4650](https://doi.org/10.1002/etc.4650).

GUPTA, Bhagwati P. et REZAI, Pouya, 2016. Microfluidic Approaches for Manipulating, Imaging, and Screening *C. elegans*. *Micromachines*. juillet 2016. Vol. 7, n° 7, pp. 123. DOI [10.3390/mi7070123](https://doi.org/10.3390/mi7070123).

HULME, S. Elizabeth, SHEVKOPLYAS, Sergey S., APFELD, Javier, FONTANA, Walter et WHITESIDES, George M., 2007. A microfabricated array of clamps for immobilizing and imaging *C. elegans*. *Lab on a Chip*. 25 octobre 2007. Vol. 7, n° 11, pp. 1515-1523. DOI [10.1039/B707861G](https://doi.org/10.1039/B707861G).

HULME ELIZABETH, S., S. SHEVKOPLYAS, Sergey, P. MCGUIGAN, Alison, APFELD, Javier, FONTANA, Walter et M. WHITESIDES, George, 2010. Lifespan-on-a-chip: microfluidic chambers for performing lifelong observation of *C. elegans*. *Lab on a Chip*. 2010. Vol. 10, n° 5, pp. 589-597. DOI [10.1039/B919265D](https://doi.org/10.1039/B919265D).

IRSN, 2023. Laboratoire de micro-irradiation, de métrologie et de dosimétrie des neutrons (LMDN) | IRSN. [en ligne]. [Consulté le 11 mai 2023 a]. Disponible à l'adresse : <https://www.irsn.fr/recherche/laboratoire-micro-irradiation-metrologie-dosimetrie-neutrons-lmdn#contexte>

IRSN, 2023. Le microfaisceau MIRCOM | IRSN. [en ligne]. [Consulté le 13 juin 2023 b]. Disponible à l'adresse : <https://www.irsn.fr/recherche/le-microfaisceau-mircom>

IRSN, 2021. *Plaquette de présentation IRSN 2021* [en ligne]. 2021. Disponible à l'adresse : https://www.irsn.fr/sites/default/files/documents/irsn/presentation/IRSN_Plaquette%20presentation_2021_v3.pdf

KHODADAD, Christina L. M., HUMMERICK, Mary E., SPENCER, LaShelle E., DIXIT, Anirudha R., RICHARDS, Jeffrey T., ROMEYN, Matthew W., SMITH, Trent M., WHEELER, Raymond M. et MASSA, Gioia D., 2020. Microbiological and Nutritional Analysis of Lettuce Crops Grown on the International Space Station. *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 2020. Vol. 11. [Consulté le 10 août 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00199>

LU, Yanxin, LIU, Yang et YANG, Chunzhang, 2017. Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 11 octobre 2017. N° 128, pp. 56450. DOI [10.3791/56450](https://doi.org/10.3791/56450).

MAREMONTI Erica, EIDE Dag M., OUGHTON Deborah H., SALBU Brit, GRAMMES Fabian, KASSAYE Yetneberk A., GUÉDON Rémi, LECOMTE-PRADINES Catherine, DAG Anders Brede, Gamma radiation induces life stage-dependent reprotoxicity in *Caenorhabditis elegans* via impairment of spermatogenesis, *Science of The Total Environment*, Volume 695, 2019, 133835, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133835>

METTLER, Fred A., 2012. Medical effects and risks of exposure to ionising radiation. *Journal of Radiological Protection*. mars 2012. Vol. 32, n° 1, pp. N9. DOI [10.1088/0952-4746/32/1/N9](https://doi.org/10.1088/0952-4746/32/1/N9).

MØLLER, Peter, LOFT, Steffen, ERSSON, Clara, KOPPEN, Gudrun, DUSINSKA, Maria et COLLINS, Andrew, 2014. On the search for an intelligible comet assay descriptor. *Frontiers in Genetics*. 17 juillet 2014. Vol. 5, pp. 217. DOI [10.3389/fgene.2014.00217](https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00217).

MUDGAL, Padmshree, BHASIN, Chitra, JOSHI, Adita et GUPTA, Radhika, 2021. Zebrafish. *Resonance*. 1 novembre 2021. Vol. 26, n° 11, pp. 1499-1521. DOI [10.1007/s12045-021-1258-1](https://doi.org/10.1007/s12045-021-1258-1).

NARANJO-GALINDO, Francisco José, AI, Ruixue, FANG, Evandro Fei, NILSEN, Hilde Loge et SENGUPTA, Tanima, 2022. C. elegans as an Animal Model to Study the Intersection of DNA Repair, Aging and Neurodegeneration. *Frontiers in Aging* [en ligne]. 2022. Vol. 3. [Consulté le 10 août 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fragi.2022.916118>

NASIADKA ANDRZEJ, CLARK MATTHEW D., 2012. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. *ILAR journal*. 2012. Vol. 53.

NORTON, William et BALLY-CUIF, Laure, 2010. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neuroscience*. 2 août 2010. Vol. 11, n° 1, pp. 90. DOI [10.1186/1471-2202-11-90](https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-90).

NÜSSLEIN-VOLHARD, Christiane, 2012. The zebrafish issue of Development. *Development*. 15 novembre 2012. Vol. 139, n° 22, pp. 4099-4103. DOI [10.1242/dev.085217](https://doi.org/10.1242/dev.085217).

PRZYBYLA, Cyrille, 2021. Space Aquaculture: Prospects for Raising Aquatic Vertebrates in a Bioregenerative Life-Support System on a Lunar Base. *Frontiers in Astronomy and Space Sciences* [en ligne]. 2021. Vol. 8. [Consulté le 10 août 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fspas.2021.699097>

PEREIRA, Sandrine, BOURRACHOT, Stéphanie, CAVALIE, Isabelle, PLAIRE, Delphine, DUTILLEUL, Morgan, GILBIN, Rodolphe et ADAM-GUILLERMIN, Christelle, 2011. Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environmental Toxicology and Chemistry*. décembre 2011. Vol. 30, n° 12, pp. 2831-2837. DOI [10.1002/etc.695](https://doi.org/10.1002/etc.695).

PRZYBYLA, Cyrille, ADAM-GUILLERMIN, Christelle et BERNARD, Muriel, 2022. PROPOSITION DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE SPATIALE POUR 2023. 2022.

PYLATIUK, Christian, SANCHEZ, Daniela, MIKUT, Ralf, ALSHUT, Rüdiger, REISCHL, Markus, HIRTH, Sofia, ROTTBAUER, Wolfgang et JUST, Steffen, 2014. Automatic Zebrafish Heartbeat Detection and Analysis for Zebrafish Embryos. *Zebrafish*. 1 août 2014. Vol. 11, n° 4, pp. 379-383. DOI [10.1089/zeb.2014.1002](https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1002).

RAJ M, Kiran et CHAKRABORTY, Suman, 2020. PDMS microfluidics: A mini review. *Journal of Applied Polymer Science*. 2020. Vol. 137, n° 27, pp. 48958. DOI [10.1002/app.48958](https://doi.org/10.1002/app.48958).

REN, Kang, ZHOU, Jianhua et WU, Hongkai, 2013. Materials for Microfluidic Chip Fabrication. *Accounts of chemical research*. 19 novembre 2013. Vol. 46, pp. 2396-2406. DOI [10.1021/ar300314s](https://doi.org/10.1021/ar300314s).

RICHARDSON, R., TRACEY-WHITE, D., WEBSTER, A. et MOOSAJEE, M., 2017. The zebrafish eye—a paradigm for investigating human ocular genetics. *Eye*. janvier 2017. Vol. 31, n° 1, pp. 68-86. DOI [10.1038/eye.2016.198](https://doi.org/10.1038/eye.2016.198).

RIECKHER, Matthias, BUJARRABAL, Arturo, DOLL, Markus A., SOLTANMOHAMMADI, Najmeh et SCHUMACHER, Björn, 2018. A simple answer to complex questions: Caenorhabditis elegans as an experimental model for examining the DNA damage response and disease genes. *Journal of Cellular Physiology*. 2018. Vol. 233, n° 4, pp. 2781-2790. DOI [10.1002/jcp.25979](https://doi.org/10.1002/jcp.25979).

RUCHIKA, SHARMA, Amit et SANEJA, Ankit, 2022. Zebrafish as a powerful alternative model organism for preclinical investigation of nanomedicines. *Drug Discovery Today*. 1 mai 2022. Vol. 27, n° 5, pp. 1513-1522. DOI [10.1016/j.drudis.2022.02.011](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.02.011).

SLEIMAN, Ahmad, 2023. Évaluation des effets mitochondriaux, génétiques et comportementaux de l'irradiation du système nerveux avec un microfaisceau de protons chez le nématode C. elegans. IRSN : Aix Marseille.

SUZUKI, Michiyo, SAKASHITA, Tetsuya, HATTORI, Yuya, YOKOTA, Yuichiro, KOBAYASHI, Yasuhiko et FUNAYAMA, Tomoo, 2018. Development of ultra-thin chips for immobilization of *Caenorhabditis elegans* in microfluidic channels during irradiation and selection of buffer solution to prevent dehydration. *Journal of Neuroscience Methods*. 1 août 2018. Vol. 306, pp. 32-37. DOI [10.1016/j.jneumeth.2018.05.025](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.05.025).

XIA, Younan et WHITESIDES, George M., 1998. Soft Lithography. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. 16 mars 1998. Vol. 37, n° 5, pp. 550-575. DOI [10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980316\)37:5<550::AID-ANIE550>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980316)37:5<550::AID-ANIE550>3.0.CO;2-G).

YOURGENOME, 2023. Why use the zebrafish in research? @yourgenome · Science website [en ligne]. [Consulté le 6 avril 2023]. Disponible à l'adresse : <https://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-zebrafish-in-research/>

YOUSAF, Muhammad Naveed, RØN, Øyvind, HAGEN, Patrycja Plebaniak et MCGURK, Charles, 2022. Monitoring fish welfare using heart rate bio-loggers in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): An insight into the surgical recovery. *Aquaculture*. 30 juin 2022. Vol. 555, pp. 738211. DOI [10.1016/j.aquaculture.2022.738211](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738211).

ZHANG, S et KUHN, JR, 2013. Cell isolation and culture. *Wormbook*. The *C. elegans* Research Community, WormBook. 21 février 2013.

Annexes

Annexe I : Protocole du test comète sur poisson zèbre

L'essai des comètes peut être réalisé sur différents types cellulaires : des érythrocytes ou des cellules isolées obtenues à l'issue d'un isolement cellulaire (cellules hépatiques, spermatozoïdes, embryons ou larves). Quel que soit le type de cellules, l'analyse par l'essai des comètes doit être réalisée extemporanément après l'isolement. Quel que soit le modèle cellulaire concerné, la densité cellulaire des suspensions a été normalisée de façon à approcher les 10^6 cellules/ml.

Le protocole auquel les cellules sont soumises est le suivant :

- 100 μ l d'un mélange à parts égales de suspension cellulaire et d'agarose à bas point de fusion (solution à 1% préparée dans du PBS 0.01M) sont déposés sur une lame microscopique préalablement enduite d'une solution d'agarose à 0.8% d'agarose à point de fusion normal). Une lamelle est ensuite déposée sur la préparation afin de l'étaler de manière homogène sur la surface de la lame. Chaque lame est alors placée sur un plateau métallique flottant sur un bain de glace afin d'accélérer la polymérisation du gel.
- Au bout de 5 minutes, après avoir retiré la lamelle, 90 μ l d'agarose à bas point de fusion (solution à 0.5% dans du PBS 0.01M) sont redéposés, afin d'assurer une protection du mélange cellule-agarose. Une nouvelle lamelle est ajoutée avant de réitérer le protocole de polymérisation du gel d'agarose. Une fois la lamelle retirée, la lame est prête.
- Les lames sont ensuite placées dans un plateau métallique pour subir la lyse. Une solution de lyse recouvre les lames. Celle-ci est préparée extemporanément à partir de la solution mère (NaCl 2.5M, EDTA disodique 100mM, Tris 10mM, le tout ajustée à pH10 avec du NaOH en pastilles) à laquelle on ajoute un détergent, le Triton X100 (1% final) et du DMSO (10% final). La lyse est réalisée pendant 1 heure à l'obscurité, tout comme la suite du protocole car l'ADN ainsi à nu est hautement photosensible.
- Après la lyse, les lames sont transférées dans la cuve d'électrophorèse et sont immergées durant 40 minutes dans un tampon de déroulement (NaOH 0.3, EDTA 1mM).
- A l'issue du déroulement, le générateur basse tension (20V) est activé, délivrant ainsi le courant nécessaire à l'établissement du champ électrophorétique (300 mA). La durée de cette électrophorèse est fixée à 24 minutes.
- Afin d'obtenir une structure bicaténaire des fragments d'ADN au sein du gel après migration, un tampon de neutralisation (Tris 0.4M ajusté à pH 7.5 avec de l'HCl concentré) est versé délicatement sur les lames, à deux reprises, à 5 minutes d'intervalle.
- Afin de conserver au mieux les lames, celles-ci sont plongées dans une solution d'éthanol pur.
- Après avoir laissé sécher les lames à température ambiante, 35 μ l de bromure d'éthidium (20ng/ml) permet le marquage de celles-ci en vue de leur analyse sous le microscope à épifluorescence. Une caméra CDD couplée à un système informatique doté d'un logiciel d'acquisition (Comet IV de Perspective Instrument) permet ensuite de procéder à l'acquisition de résultats.

Annexe II : Tableaux des résultats des tests comètes des irradiations d'embryons de bars des irradiations de mars et octobre 2022, dans le cadre du projet Corafe

MARS	H24	SE	H48	SE
Moyenne control	1,15	0,064	0,90	0,095
Moyenne exposed	1,68	0,094	2,03	0,150
p-value test de permutation	0,073		0	

OCTOBRE	H24	SE	H72	SE
Moyenne control	3,13	0,117	2,31	0,085
Moyenne exposed	2,34	0,088	6,32	0,237
p-value test de permutation	0,3835		5e-04	

Annexe III : Protocole d'isolement cellulaire *C. elegans* (Wormbook, Imanikia et al., 2016)

1. Mettre les vers irradiés sur une lame, découper les têtes, et les récupérer au fur et à mesure dans un Eppendorf 1,5mL avec 10uL de ddH₂O déjà dedans, et sur glace.
2. Ajuster le volume à environ 0,5mL avec du ddH₂O et centrifuger à 1,300g pendant 1 min et enlever le surnageant. Répéter pour un total de 3 lavages au ddH₂O.
3. Enlever le surnageant, faire un dernier lavage au ddH₂O 2min à 16,000g.
4. Utiliser 30µL à 80µL du culot pour l'isolement
5. Ajouter 200µl de solution SDS-DTT (ou solution 0,5%Triton X-100/ SDS-DTT solution : 20 mM HEPES buffer, pH 8, 0.25% SDS, 200 mM DTT, and 3% sucrose (Imanika et al, 2016)) au culot et tapoter pour mélanger. Incuber exactement 4 min à température ambiante.
6. Immédiatement après le traitement SDS-DTT, ajouter 800µl d'egg buffer, et tapoter pour mélanger.
7. Centrifuger 1 min à 16,000 g, enlever le surnageant, et répéter cette étape 4 autres fois avec 1mL d'egg buffer.
8. Ajouter un aliquote de 150µL de papaine (10 mg/mL, conservation -20°C) au culot, et écraser mécaniquement avec un Potter en même temps. L'homogénéisation dure généralement 6min. La durée totale d'incubation n'excède pas 15min (généralement entre 8 et 12min) pour éviter d'abîmer les cellules.
9. Arrêter la réaction enzymatique avec 1mL de FBS froid, et centrifuge à 4°C pendant 5min à 9600g.
10. Faire deux lavages au PBS (1mL), suivis de centrifugations à 4°C pendant 5min à 9600g.
11. Resuspendre le culot dans 300µL de PBS et laisser sur glace pendant 30min. Les débris vont tomber au fond du tube et les cellules vont rester en suspension.

Solutions :

- *0,5%Triton X-100/ SDS-DTT solution : 20 mM HEPES buffer, pH 8, 0.25% SDS, 200 mM DTT, and 3% sucrose (Imanika et al, 2016)

Tampon de lyse

	Stock	Concentrations finales	10,25mL
Hepes pH 8,0	1M	20mM	0,2 mL
SDS	10%	0,25%	0,25 mL
DTT	1M	200mM	2 mL
Sucrose	60%	3%	0,5 mL
Triton		0,5%	51,25 µL
ddH ₂ O	▪	▪	7,25 mL

Solutions mères

	Poudre	ddH ₂ O
SDS	1 g	9 mL
DTT	1,54 g	8,46 mL
Sucrose	6 g	4 mL

Filtration à 0,22µm, conservation -20°C dans des aliquotes de 200µL

▪ DTT-SDS

	Stock	Concentrations finales	10,25mL
Hepes pH 8,0	1M	20mM	0,2 mL
SDS	10%	0,25%	0,25 mL
DTT	1M	200mM	2 mL
Sucrose	60%	3%	0,5 mL
ddH ₂ O	▪	▪	7,75 mL

▪ ** Egg buffer 25 mM HEPES, pH 7.3, 118 mM NaCl, 48 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ (Imanika et al, 2016)

	Stock	Concentrations finales	250mL
Hepes pH 7,3	1M	25mM	6,25 mL
NaCl	2M	118mM	14,75 mL
KCl	2M	48mM	6 mL
CaCl ₂	1M	2mM	0,5 mL
MgCl ₂	1M	2mM	0,5 mL
ddH ₂ O	▪	▪	222 mL

Solutions mères

	Poudre	ddH ₂ O
NaCl	2,34g	17,66 mL
KCl	1,49g	8,51 mL
CaCl ₂	1,11g	8,89 mL
MgCl ₂	0,96g	9,04 mL

Filtration à 0,22µm, conservation 4°C

▪ Papaine (10mg/mL) dans du PBS ou de l'eau

	Diplôme : Ingénieur Agronome Spécialité : Sciences Halieutiques et Aquacoles Spécialisation / option : Aquaculture Enseignant référent : Bastien Sadoul
Auteur : Sarah ELIE Date de naissance* : 05/08/2000	Organisme d'accueil : IRSN Adresse : Cadarache, 13115 Saint Paul Lez Durance
Nb pages : 46 Annexes : 3	
Année de soutenance : 2023	Maître de stage : Christelle Adam-Guillermin
Titre français : Validation de l'utilisation de puces microfluidiques Titre anglais : Validation of the use of microfluidic chips	
Résumé (1600 caractères maximum) : Les rayonnements ionisants proviennent de nombreuses sources différentes et peuvent avoir des impacts très importants sur l'Homme et l'Environnement. Dans le cadre de ce stage à l'IRSN, j'ai travaillé sur le développement et l'utilisation de puces microfluidiques pour la micro-irradiation aux protons d'embryons de poisson dans le cadre du projet Corafe pour transporter des œufs de bar sur la Lune, et de <i>C. elegans</i> dans le cadre d'une thèse sur l'impact des protons sur le système nerveux central en radiothérapie. Deux espèces modèles ont été utilisées que sont <i>Danio rerio</i> et <i>Caenorhabditis elegans</i> , pour tester les puces et analyser les dommages provoqués. Les tests comètes réalisés sur poisson n'ont pas montré de dommages à l'ADN causés par les puces, mais les résultats des irradiations précédentes ont montré un effet significatif de la dose et de l'exposition. L'isolement des cellules de tête de nématodes a été possible, mais les tests comètes n'ont pas été concluants. Les puces microfluidiques sont des dispositifs fabriqués majoritairement en polymères, et composés de canaux et de puits. La puce pour poisson est composée de deux canaux en arc-de-cercle dont un pour le refroidissement et un pour les œufs, et sera utilisée pour les prochaines micro-irradiations en octobre 2023 sur MIRCOM. La puce pour nématodes est composée de 8 canaux avec des puits pour insérer les vers, et les prochaines modifications devraient permettre l'entrée des vers adultes dans les canaux.	
Abstract (1600 caractères maximum) : Ionizing radiation comes from many different sources and can have very significant impacts on humans and the environment. As part of this internship at the IRSN, I worked on the development and use of microfluidic chips for protonic micro-irradiation of fish embryos as part of the Corafe project to transport sea bass eggs to the Moon, and of <i>C. elegans</i> part of a thesis project on the impact of protons on the central nervous system in radiotherapy. Two model species were used, <i>Danio rerio</i> and <i>Caenorhabditis elegans</i> , to test the chips and analyze the damage caused. Comet assays on fish did not show any DNA damages caused by chips but results from previous irradiations showed a significant effect of dose and exposure. Isolation of nematode head cells was possible, but comet assays were inconclusive. Microfluidic chips are devices made mainly of polymers and composed of channels and wells. The fish chip consists of two semicircle channels, one for cooling and one for eggs, and will be used for the next micro-irradiations in October 2023 on MIRCOM. The nematode chip is composed of 8 channels with wells to insert worms, and the next modifications should allow the entry of adult worms into the channels.	
Mots-clés : puce microfluidique, <i>Danio rerio</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> , dommages à l'ADN, rayonnements ionisants Key Words: microfluidic chip, <i>Danio rerio</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> , DNA damages, ionizing radiations	

* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires